

## AmpC BETA-LAKTAMAZLAR\*

Serpil COŞKUN<sup>1</sup>, Nurten ALTANLAR<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü, ANKARA

<sup>2</sup>Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA

### ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL'ler) karbapenem ve sefamisinler hariç olmak üzere penisilin, oksimi-nosefalosporin ve monobaktamlara direnç sağlamakta, ancak bu enzimlerin hidrolitik aktiviteleri genellikle klavulanik asitle inhibe olmaktadır. AmpC beta-laktamazlar ise karbapenem hariç olmak üzere daha geniş spektrumdaki beta-laktam antibiyotiklere direnç sağlamakta ve bu enzimlerin hidrolitik aktivitesi klavulanik asitle inhibe olmamaktadır. Sefamisin direnci AmpC beta-laktamazların varlığı hakkında fikir vermektedir ancak porin kaybı da bu durumu taklit edebilmektedir. AmpC beta-laktamazların tanısında kullanılan fenotipik ve moleküler yöntemler AmpC beta-laktamazlarla porin kaybını birbirinden ayırdetmektedirler. Fakat fenotipik yöntemlerin hiçbiri kromozomal kaynaklı AmpC beta-laktamaz ile plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamazları ayırt edememektedir. AmpC beta-laktamaz tanısında kullanılan indirekt yöntemler; Üç boyutlu enzim ekstrakt test (3BT), Tris-EDTA'lı AmpC disk testi, sefoksitin agar besiyerinde üretme (CAM), modifiye Hodge testi ile spot inokülasyon testidir. AmpC enzim tayininde doğrulama testleri olarak önerilen inhibitör temelli direkt yöntemler; boronik asit (BA) inhibisyon disk testi, LN-2-128, Ro-48-1220 inhibisyon disk testi, Syn2190 inhibisyon disk testi, piperasilin ve piperasilin-tazobaktam inhibisyon disk testi, kloksasilin çift disk sinerji testi, E-test, izoelektrik odaklama metodu (İEO), multipleks PCR, konjugasyon deneyleri ve ELİZA test. Bu derleme yazıda yukarıda bahsedilen yöntemlerin performansları değerlendirilmiş ve indirekt ve direkt yöntemler kullanılarak AmpC+GSBL, sadece AmpC beta-laktamaz ve sadece GSBL tespit edilen çalışmalar özetlenmiştir.

**Anahtar sözcükler:** AmpC beta-laktamaz, GSBL, inhibitör temelli testler, *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazi

### SUMMARY

#### AmpC Beta-lactamases

Expanded-spectrum beta-lactamases (ESBL's) can confer resistance to penicillins, oximinoccephalosporins and monobactam but not carbapenems and cephamycin, and their hydrolytic activities are usually inhibited by clavulanic acid. AmpC beta-lactamases also confer resistance to expanded-spectrum beta-lactam antibiotics but not carbapenems, and their hydrolytic activities are poorly inhibited by clavulanic acid. Resistance to a cephamycin is suggestive of the presence an AmpC enzyme but this can be mimicked by porin loss. Phenotypic and molecular methods that used in detection of AmpC beta-lactamases distinguish between AmpC beta-lactamase and porin loss. But none of the phenotypic methods can distinguish between plasmid-borne-AmpC beta-lactamase and chromosome-borne AmpC beta-lactamase. Indirect methods that used in detection of AmpC beta-lactamases are three dimensional extract test (3DET), AmpC disk test (impregnated Tris-EDTA), cefoxitin agar medium (CAM), modified Hodge test and spot inoculation test. Direct methods (inhibitor based methods) that used in detection of AmpC beta-lactamases are boronic acid (BA), LN-2-128, Ro-48-1220, Syn2190, piperacilin and piperacilin-tazobactam inhibition test, cloxacillin double disk synergic test, E-test, isoelectric focus method (IEF), multiplex PCR, conjugation test and ELISA test. In this paper the performances of these methods that mentioned above are evaluated and summarized investigations about detection of both AmpC and ESBL producers, only AmpC producers and only ESBL producers by using indirect and direct methods.

**Keywords:** AmpC beta-lactamase, ESBL, inhibitor based test, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

**İletişim adresi:** Serpil Coşkun. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, ANKARA  
GSM: (0532) 395 31 62  
e-posta: srpl50star@gmail.com

Alındığı tarih: 02.07.2012; Yayına kabul: 27.09.2012

\*Bu makale kısmen Prof Dr Nurten Altanlar'ın danışmanlığında Serpil Coşkun tarafından doktora tezi olarak sunulmuştur (Ankara Üniversitesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2011).

## GİRİŞ

Araştırmalara göre genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) tarama testi pozitif çıkan fakat CLSI'nin doğrulama testine göre GSBL negatif bulunan izolatların oranı son zamanlarda % 75'lere kadar ulaşmıştır. Bu tür izolatlarda sonradan yapılan çalışmalarla AmpC beta-laktamaz varlığı gösterilmiştir<sup>(38)</sup>. GSBL üreten mikroorganizmaları plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz üreten mikroorganizmalardan ayırdetmek sürveyans, epidemiyolojik ve hastane infeksiyonlarını kontrol altına almak açısından önemlidir<sup>(35)</sup>. İndükleyici ampR geninden yoksun olan plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar, rutin duyarlılık testinde kopyalanmış gen sayısına bağlı<sup>(16,37)</sup> olarak seftazidim veya sefotaksim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere yanlı olarak duyarlı görünmekte ve bunlarla yapılan tedavi sonucunda dereprese mutantlar oluşarak hastalarda klinik başarısızlık saptanmaktadır<sup>(7,33)</sup>.

İndüklenebilen plazmid aracılı AmpC enzimler ise tıpkı kromozomal AmpC enzimleri gibi hastadan ilk izole edildiğinde üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı bulunduğu halde bu ilaçlar klinikte kullanıldığında dereprese mutantlar oluştuğu için tedavi başarısız olur<sup>(18)</sup>.

Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar GSBL'den daha az yaygın olmalarına rağmen onlardan daha geniş spektrumda beta-laktam antibiyotiklere direnç sağlamaktadırlar<sup>(2)</sup>. Bu testlerin sadece epidemiyolojik ve akademik araştırmalar için kullanılması gerektiği düşünülse de porin kaybına bağlı sefoksitin direncini AmpC enzim varlığından ayırdetmek ve AmpC'nin GSBL varlığını maskeleymesini önlemek için rutin olarak uygulanması gerekir<sup>(41,11)</sup>.

Şimdiye kadar belirlenmiş 29 farklı plazmid aracılı AmpC beta-laktamazı kodlayan 29 adet gen bölgesi, 6 grupta (CIT, EBC, ACC, DHA, MOX, FOX) toplanmış, GenBank'ta kaydedilmiştir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>)<sup>(35)</sup>. Ancak muhtemel plazmidik AmpC progenitörü olabileceği düşünülen bir kısım kromozomal AmpC beta-laktamaz genleri belirlenerek GenBank'ta (<http://www.lahey.org/Studies/>) depolanmıştır.

## AmpC beta-laktamaz testinde kullanılan tarama testleri

1-Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere ve sefoksitine karşı azalmış duyarlılık, oldukça duyarlı olmakla birlikte nonspesifiktir. Çünkü, bu kriterler *Escherichia coli*'de kromozomal AmpC'nin aşırı üretilmesi veya membran geçirgenliğinin azalması durumunda da görülebilmektedir.

2-Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç, AmpC enzim varlığında görüldüğü gibi beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli TEM (IRT) beta-laktamazların varlığında veya çok fazla miktarda üretilen GSBL, TEM-1, SHV-1 enzimleri, MBL ve sınıf D'deki bazı OXA tip enzim varlığında da görülebilmektedir.

3-Sefepime ve sefpiroma duyarlılık, AmpC enzimleri GSBL ile birlikte ise gözden kaçabildiği için sensitivitesi ve spesifitesi oldukça düşüktür<sup>(17)</sup>.

4-Tarama testinde beta-laktam antibiyotikler içinde sefpodoksimin en az negatif sonuç verdiği gözlenmiştir<sup>(22)</sup>. UK National Guidelines for Laboratories tarafından GSBL ve AmpC beta-laktamaz taramasında 'sefpodoksim' veya 'seftazidim ile sefotaksim' ikilisinin kullanılması önerilmiştir<sup>(45)</sup>.

5-Nonfermentatif Gram negatif bakterilerde sefoksitine karşı efluks veya porin kaybı gibi nedenlerden ötürü çok sık direnç geliştiği için bu bakterilerde AmpC enzimi yönünden sefoksitin tarama testi faydasızdır<sup>(17)</sup>.

## AmpC beta-laktamazların laboratuvar tanısı

### 1-İzolelektrik odaklama metodu (İEO):

Beta-laktamazların izoelektrik noktasını (pI) belirlenmek için uygulanan bir işlemdir. Plazmid aracılı beta-laktamazların pI değeri 6.4 ile 9.4 arasında değişmektedir. Ancak bu aralıkta bazı GSBL türü enzimler bulunabileceğinden, tespit edilen bantların kloksasilin ile inhibe olarak kaybolduğunun gösterilmesi gerekir. Rutin laboratuvarların kullanımı için zahmetli test olup deneyimli kişilere ihtiyaç duyulduğundan ancak referans laboratuvarlarında uygulanabilmektedir<sup>(23)</sup>.

Bu yöntemde bakterilerdeki enzimler sonikasyon ile ekstrakte edilmektedir. Şöyle ki; incelenecek bakterinin kanlı agardaki 24 saatlik

kültüründen birkaç koloni alınarak 10 ml triptikaz soy buyyon içerisine inoküle edildikten sonra 35°C'de 24 saat inkübe edilip 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir, üstteki sıvı döküldükten sonra üzerine tampon eklenir ve soğutmalı santrifüjde 13,000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilip bu işlem 3 kez tekrar edilir. Yıkama sonunda süpernatant dökülerek çökelti üzerine tekrar 500 µl tampon eklenerek 3 kez sonikasyon işlemi ve enzimlerin korunması için aralarda buz ile soğutma işlemi uygulanır. Sonikasyon sonrasında 14,000 rpm'de +4°C'de 60 dakika santrifüj işlemi uygulandıktan sonra üstteki sıvıdan 50 µl alınarak nitrosetin çözeltisi (500 µg/ml) eklendikten sonra renk değişimi gözlenir. Rengi sarıdan kırmızıya dönen enzim ekstraktlarına poliakrilamid jel üzerinde elektroforez işlemi uygulanır. Her elektroforez işlemi sırasında izoelektrik noktası bilinen beta-laktamaz enzimi pozitif kontrol olarak kullanılmaktadır. Elektroforez sonlandığında, enzim bantlarını görünür hâle getirmek için, jel üzerine nitrosetin çözeltisi yayılarak ortaya çıkan pembe bantlar milimetrik kağıda aktarılmakta ve milimetrik hesaplama ile izoelektrik noktaları hesaplanmaktadır<sup>(20)</sup>.

**2-Konjugasyon deneyleri:** AmpC tipi enzim genlerinin konjugatif olup olmadığını göstermek için konjugasyon veya transformasyon deneylerinin yapılması gerekmektedir. Bu testler sadece referans laboratuvarlarında yapılabilmektedir<sup>(17)</sup>. Şöyle ki; konjugasyon deneyinde kullanılmak üzere alıcı olarak rifampisine dirençli *E.coli*, verici olarak hastadan izole edilen suş kullanılır. Her iki suşun yoğun süspansiyonundan (10<sup>9</sup> cfu/ml) Müller Hinton (MH) buyyona ekim yapıp 35°C'de 18 saat bekledikten sonra bu süre sonunda verici suşun inhibisyonu için 64 µg/ml nalidiksik asit, alıcı suşun inhibisyonu için de 64 µg/ml sefoksitin eklenen MacConkey agara buyyondan ekim yapıp bir gece inkübasyondan sonra sefoksitin dirençli transkonjugantlar elde edilmektedir<sup>(5)</sup>. Konjugasyon deneyleri ile ilgili çalışmalara bakılacak olursa; Çin'de sefoksitin dirençli 32 GSBL pozitif izolatta İEO yöntemi ile AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmış, konjugasyon deneyleri ve dizi analizleri yapılmıştır. GSBL üreten 32 izolatin 7'inde DHA-1 AmpC beta-laktamazı saptan-

mış, konjugasyon deneylerinde sadece biri transfer edilebilmiştir<sup>(46)</sup>. ABD'de yapılan çalışmada, sefoksitin dirençli 45 izolatin 16'ında AmpC enzimi saptanmış, fakat sadece 8'i alıcı hücreye transfer edilebilmiştir<sup>(13)</sup>. Başka bir çalışmada, 389 kan kültürünün 65'inde GSBL veya AmpC beta-laktamaz tespit edilmiş, bunların 14'ünde DHA-1, 14'ünde CMY-1 saptanmıştır. Konjugasyon deneyinde CMY-1 bulunan izolatların çoğu alıcı hücreye aktarıldığı halde DHA-1 bulunan izolatlardaki sefoksitin direnç genleri aktarılamamıştır<sup>(33)</sup>.

**3-AmpC beta-laktamazların tayininde doğrulama testleri olarak kullanılan (indirekt) yöntemler:** Üç boyutlu enzim ekstrakt test (3BT), Tris-EDTA'lı AmpC disk testi, sefoksitin agar besiyerinde üretme (CAM) ve modifiye Hodge ve spot inokülasyon testidir. Bu testler porin kaybına bağlı sefoksitin direncini AmpC beta-laktamaza bağlı sefoksitin direncinden ayırabilen ve sefoksitin direnci esasına dayanılarak yapılan testlerdir<sup>(8,39)</sup>.

**3.1.Üç boyutlu enzim ekstrakt test (3BT) ile ilgili çalışmalar:** Başlangıçta 3BT doğrulama amaçlı olarak kullanılmıştır. Şöyle ki, bakterinin, kanlı agardaki 24 saatlik kültüründen triptik soy buyyon içerisinden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanır. Bu süspansiyondan 50 µl alınarak 12 ml triptik soy buyyon içerisine inoküle edildikten sonra 35°C'de 4 saat inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda hücreler santrifüj işlemi ile konsantre edilip üstteki sıvı döküldükten sonra beş kez dondurulup çözülerek enzim ekstraktı elde edilir. CLSI'nin standart disk difüzyon önerileri doğrultusunda MH buyyonda 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanmış olan duyarlı ATCC *E.coli* suşu, MH agar yüzeyine yayıldıktan sonra 30 µg'lık sefoksitin diski bu plağın ortasına yerleştirilir. Steril bir bistüri yardımıyla sefoksitin diski 5 mm uzaklığından başlanarak plağın kenarına doğru ışınal tarzda oluklar oluşturulduktan sonra enzim ekstraktından 25-30 µl'lik miktar, oluktan taşmayacak şekilde merkezden kenara doğru damlatılıp bir gece inkübe edilir. Testin sonucu değerlendirilirken, oluğun sefoksitin etrafındaki inhibisyon zonunu kestiği noktada üremenin artarak inhibisyon zonunda meydana getirdiği bozulma, pozitif olarak kabul edilmektedir<sup>(3,13)</sup>.

Bu testle ilgili yapılan çalışmalar; ABD’de toplanan 1123 *Klebsiella pneumoniae* izolatı için den kloksasilinle inhibe olan ve sefoksitin dirençli 160 *K.pneumoniae* izolatında 3BT, İEO, multipleks PCR ve dizi analizleri yapılmıştır. Kloksasilin ile inhibe olan sefoksitin dirençli 160 *K.pneumoniae* izolatının % 28.8’inde AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir<sup>(30)</sup>. Yine ABD’deki bir çalışmada, AmpC beta-laktamaz tayini için İEO testinde kloksasilin ile inhibe olan suşlara Syn2190 ihtiva eden disklerle çift disk sinerji testi ve 3BT’i yapılmıştır. Bu çalışmada 190 *K.pneumoniae* izolatı içinde sefoksitin dirençli 28 izolatın 5 (% 18)’inde 3BT’i ve çift disk sinerji testi pozitif olarak bulunmuştur. Tespit edilen 5 AmpC beta-laktamazın 3’ü FOX-5, 2’si ACT-1 olup tümü konjugasyonla alıcı hücreye transfer edilmiştir<sup>(12)</sup>. Hacettepe Üniversitesinde yapılan çalışmada, GSBL üreten 23 izolatın 3BT’inde yalancı AmpC pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir. AmpC varlığı önce (kloksasilin ile seftazidim ve sefotaksimle yapılan) çift disk sinerji testi ile araştırılmıştır. Beta-laktam antibiyotiklere dirençli izolatlara hem boronik asit-klavulanik asit (BA-CA) hem de 3BT testi uygulanmıştır. Gerek BA-CA ve gerekse 3BT’de pozitif bulunan 58 izolata İEO yöntemi ve multipleks PCR uygulanmış, ancak 58 izolatın sadece 7’inde (% 12) PCR’la AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir. Bunların 2’sinde 3BT’i AmpC negatif sonuç vermiştir<sup>(1)</sup>.

**3.2.CAM yöntemi:** Sefoksitin ihtiva eden agarda açılan kuyucuklara 3BT’de olduğu gibi enzim ekstraktının doldurulması ile gerçekleştirilen bir testtir. 3BT ile aynı sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu belirtilmekle beraber santrifüj gerektiren ve yoğun emek isteyen bir yöntem olduğu bildirilmiştir<sup>(32)</sup>.

**3.3.Modifiye Hodge testi:** 3BT’nin modifiye edilmiş şeklidir. Ancak CMY-10 AmpC enzim varlığında sensitivitesi yüksek iken DHA-1’de sensitivitesinin düşük olduğu belirtilmiştir<sup>(26)</sup>.

**3.4.Tris-EDTA’lı AmpC disk testi:** Tris-EDTA kullanılarak bakteri hücre geçirgenliğinin artırılması ve bakterideki beta-laktamaz salınımının kolaylaştırılması esas alınmaktadır. GSBL ile birlikte bulunmasının sonuç üzerinde etkili olmadığı ancak, sefoksitin ve karbapenemleri hidrolize edebilen (KPC-2 gibi) nadir bulunan

AmpC dışı beta-laktamaz varlığının yanlış pozitifliğe neden olabileceği bildirilmiştir. AmpC disk testi ile ilgili çalışmalara baktığımızda; sefoksitin dirençli 140 izolatta kloksasilinle inhibisyon, İEO, AmpC disk testi, multipleks PCR ve dizi analizleri yapılmış, sefoksitin dirençli 140 izolatın 44’ü AmpC disk testi ile pozitif sonuç vermiştir. Bunların 42’inde (% 95.4) multipleks PCR’la AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir<sup>(6)</sup>. Türkiye’de yapılan bir başka çalışmada ise kloksasilin inhibisyon ve İEO yapılmadan sadece sefoksitin dirençli, BA inhibisyon testi pozitif olan izolatlara AmpC disk testi uygulanmıştır. BA testi pozitif 33 izolatının 27’inde (% 81.8) PCR’la AmpC enzimi saptanmıştır<sup>(10)</sup>.

Bir araştırmada AmpC beta-laktamaz tespitinde uygulanan tarama ve doğrulama testlerinin sensitivite ve spesifiteleri karşılaştırılmıştır. Seftazidim ve sefoksitin direnci ile sefepim duyarlılığına göre tarama testi uygulanmıştır. Doğrulama yöntemi olarak inhibitör temelli testler, AmpC E test, TRİS-EDTA ve MAST ID D6SC disk testi, kromojenik testler, 3BT ve multipleks PCR kullanılmış, 246 izolatın 74’ünde AmpC beta-laktamaz saptanmıştır. Tarama testlerinin sensitivite % 47-99, spesifiteleri % 45-95 arasında bulunmuş, doğrulama testlerinin sensitivite % 19-97, spesifiteleri % 88-100 arasında bulunmuştur. PCR ve 3BT referans olarak alındığında doğrulama testleri arasında sensitivitesi (>% 90) ve spesifitesi (> % 90) en yüksek testin TRİS-EDTA ve MAST ID D6SC disk testinin olduğu belirtilmiştir<sup>(21)</sup>.

**3.5. Spot inokülasyon test ile ilgili bir çalışma:** Enzim ekstraktları ve/veya bakteri süspansiyonu ATCC 25922 *E.coli*’nin inoküle edildiği ve sefoksitin diskinin yerleştirildiği MH agar plağına damlatılarak yapılmıştır. Birinci aşamada öze ile alınan 8-10 koloni agarda açılan yarıkların içine ekilmiştir. İkinci aşamada yoğun bakteri süspansiyonu antibiyotik disklerinden 5 mm uzaktan başlanarak çizgi şeklinde ekim yapılmıştır. Üçüncü aşamada 5-6 koloni sefoksitin diskinin 7-8 mm ve 10-12 mm uzağa nokta şeklinde ekim yapılmıştır. Aynı işlem enzim ekstraktlarıyla da tekrarlanmıştır. En duyarlı ve kolay uygulanan yöntemin bakteri süspansiyonu ile yapılan spot test olduğu bildirilmiştir. Spot test ile 10 izolatın 9’u pozitif sonuç verdiği

halde<sup>(39)</sup> Türkiye’de yapılan başka bir çalışmada sefoksitin diskinden 4-5 mm uzağa yapılan spot inokülasyon testinde 43 AmpC pozitif izolatın sadece 1’inde (GSBL+AmpC beta-laktamaz sentezleyen) distorsiyon görüldüğü rapor edilmiştir<sup>(10)</sup>.

**4.AmpC enzim tayininde doğrulama testleri olarak önerilen inhibitör temelli (direkt) yöntemler:** Boronik asit (BA) ile yapılan inhibisyon disk testi<sup>(9,11,48)</sup>, LN-2-128, Ro-48-1220 ile inhibisyon disk testi<sup>(8)</sup>, Syn2190 ile inhibisyon disk testi<sup>(7)</sup>, piperasilin ve piperasilin-tazobaktam diskleri ile yapılan inhibisyon disk testi<sup>(42)</sup>, kloksasilin çift disk sinerji<sup>(29)</sup>, izoelektrik odaklama (İEO)<sup>(23)</sup> ve immunolojik olarak ELİZA ile immunglobulin araştırması<sup>(17)</sup>.

**4.1.Moleküler yöntemler:** Multipleks PCR<sup>(35)</sup>, oligoprimlerle yapılan dizi analizleri, PCR bazlı multipleks asimetrik mikroarray yöntemi<sup>(20)</sup>, pulsed field gel electrophoresis (PFGE)<sup>(33,47)</sup>.

**4.2.Kloksasilin ile çift disk sinerji testi:** MH agarda CLSI’nin önerilerine göre 500 µg kloksasilin ihtiva eden diskten merkezden merkeze 2.5 cm mesafede olacak şekilde seftazidim ve sefotaksim diskleri yerleştirilerek yapılan bu testte sefalosporinlerden herhangi birinin kloksasiline doğru görülen zon genişlemesi AmpC varlığı olarak değerlendirilmektedir. *E.coli* için özgülüğünün % 10.3 olduğu rapor edilmiştir<sup>(29)</sup>.

**4.3.E testle AmpC enzim tespiti:** Sefotetan veya sefoksitin ile kloksasilin emdirilmiş sefotetan veya sefoksitin kombine disklerle yapılmaktadır. Bir çalışmada 500 izolatla yapılan E testinin sensitivitesi % 88 - % 93 olarak bildirilmiştir<sup>(23)</sup>.

**4.4.Ro-48-1220 ile LN-2-1220 beta-laktamaz inhibitör testi:** Hem sınıf A, hem sınıf C enzim inhibitörleridirler. Beta-laktam antibiyotiklerle kombine Ro-48-1220 ve LN-2-1220’nin kullanıldığı çift disk sinerji testinde inhibisyon zon farkının >4 mm olması AmpC pozitif olarak değerlendirilmiştir. AmpC tespitinde sefotetan-LN-2-1220 ile sefotetan-Ro-48-1220’nin en iyi sonucu verdiği, sefamisin dışı sefalosporinlerle spesifitesinin düştüğü görülmüştür<sup>(8)</sup>.

**4.5.Syn2190 ile inhibisyon testi:** Bir monobaktam türevi olan Syn2190, AmpC üzerinde etkili, GSBL üzerinde ise önemsenmeye-

cek düzeyde etkili bir inhibitördür. AmpC beta-laktamaz tespitinde Syn 2190 (150 µg) inhibitörünün LN-2-128 ve Ro 48-1220’den daha geniş spektrumdaki bakterilerde kullanılabilirdiği, ayrıca sefotetan/Syn 2190 kombinasyonunun LN-2-128 ile Ro-48-1220’ye oranla tekrarlanabilirliğinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir<sup>(7,36)</sup>.

**4.6.Piperasilin-tazobaktam ile çift disk sinerji testi:** Bazı AmpC tipi enzimler tazobaktama duyarlı bulunduğu için piperasilin ve piperasilin-tazobaktam kombine diskleri ile yapılan sinerji testinde piperasilinin piperasilin/tazobaktama göre zon çapının >5 mm olmasının AmpC taramasında geçerli olduğu önerilmektedir<sup>(4)</sup>. Bu testle pozitif çıkan izolatların 3BT ve TRİS-EDTA disk testiyle pozitif sonuç verdiği gösterilmiştir<sup>(42)</sup>.

**4.7. BA ve CA ile inhibisyona dayalı çalışmalar**

**4.7.1. Sadece BA inhibisyon testi ile AmpC beta-laktamaz araştırması yapılan çalışmalar:** Bir çalışmada, sefoksitin dirençli 271 izolatla 3BT ve BA ve İEO testi ile AmpC beta-laktamaz araştırılmıştır<sup>(11)</sup>. Bu çalışmada PCR’la AmpC beta-laktamaz saptanan izolatlarla BA ile inhibisyon testi uygulanmıştır. Sonuç olarak sefoksitin dirençli 271 izolatın 55’inde (% 20) PCR’la AmpC pozitif (CIT, FOX ve DHA grubu) olarak bulunmuştur<sup>(11)</sup>.

Bazı araştırmacıların yaptığı çalışmada GSBL+AmpC beta-laktamaz üreten izolatlarda BA ile AmpC, CA ile GSBL araştırıldığında, farklı sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, SHV-7, TEM-1 gibi GSBL’lerde veya CMY-2 gibi AmpC enzim varlığında her iki inhibitörle de pozitif sonuç alınmıştır. Bunun dışında ACT-1 ve CTX-M üreten izolatlar CA ile GSBL pozitif sonuç verdikleri halde BA ile yanlış AmpC negatif sonuç vermişlerdir<sup>(43)</sup>. Bir başka çalışmada ise, CMY-2 + SHV-5 varlığında ve DHA-1 + SHV-5 varlığında CA ile GSBL negatif sonuç alınmıştır<sup>(49)</sup>.

Bir çalışmada geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerden en az birine dirençli 80 izolatla CA ile GSBL, BA ile AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmıştır. Daha sonra İEO yöntemi ile izoelektrik noktaları tayin edildikten sonra multipleks PCR’la AmpC beta-laktamaz tayini yapılmıştır. CA ile 80 izolatın 27’i (% 33.8) GSBL

pozitif bulunurken 31'i (% 38.7) BA ile AmpC pozitif bulunmuştur. BA testi pozitif çıkan 31 izolatın 18'inde (% 58) PCR'la AmpC geni saptanmıştır<sup>(43)</sup>. Türkiye'de yapılan bir çalışmada 2006-2008 yılları arasında seftazidim dirençli 553 (*E.coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.) izolat içinde sefoksitin dirençli izolatlarda AmpC beta-laktamaz araştırması için 2 farklı fenotipik yöntem uygulanmıştır. Birincisi BA emdirilmiş disklerle yapılan çift disk sinerji testi, ikincisi seftazidim ve sefotetan antibiyotikleri ile yapılan BA inhibisyon testidir. Sefoksitin dirençli 46 izolatın hepsine multipleks PCR uygulanmış, 16'ında (% 34.8) PCR'la AmpC pozitif bulunmuştur. Bu çalışmada sadece üç PCR-AmpC pozitif hem BA kombine disk testi ile hem de çift disk sinerji testi ile pozitif sonuç vermiştir. BA testleri negatif çıktığı halde 7 izolatta AmpC beta-laktamaz geni saptanmış, BA testlerinden en az biri ile pozitif çıktığı halde 21 izolat PCR'la AmpC beta-laktamaz negatif bulunmuştur<sup>(25)</sup>. Bu çalışmalardan da anlaşıldığı gibi sadece BA ile yapılan inhibisyon testinde GSBL'ye bağlı olarak yanlış AmpC beta-laktamaz pozitif sonuç alınabildiği gibi sadece CA kullanıldığında<sup>(38)</sup> bazı AmpC beta-laktamazlara ve sınıf A karbapenemazlara<sup>(22)</sup> bağlı olarak yanlış GSBL pozitif sonuç alınabilmektedir.

**4.7.2. GSBL+AmpC pozitif izolatlarda BA'ya CA ilavesi ile sadece AmpC beta-laktamaz tayini yapılan çalışmalar:** Bazı araştırmacılar tarafından sefopodoksim ile AmpC beta-laktamaz inhibitörü olarak BZBTH2B'nin [benzo (b) tiopen-2-boronik asit] kullanılması önerilmiştir. Sefopodoksim-BA'ya klavulanik asit eklendiğinde [(CPD (10 µg) + benzo (b) tiopen-2-boronik asit (64 µg) + CA (1 µg)] ACC-1, FOX-4, CMY-2, ACT-1 ve MIR-1 enzimlerin tamamının tespit edildiği bildirilmiştir<sup>(9)</sup>.

**4.7.3. BA-CA ile hem AmpC beta-laktamaz hem de GSBL tayini yapılan çalışmalar:** Bir çalışmada, sefoksitin dirençli 100 izolatta GSBL ve AmpC beta-laktamaz tayininde fenotipik olarak BA-CA kombine disk testi uygulanmıştır. Sefoksitin dirençli olup BA-CA testi ile AmpC pozitif bulunan 33 *K.pneumoniae* izolatının hepsinde PCR'la AmpC beta-laktamaz pozitif bulunurken yine sefoksitin dirençli olup BA-CA ile AmpC pozitif bulunan 7 *E.coli* izolatının sadece

2'sinde PCR'la AmpC beta-laktamaz geni saptanmıştır. Bu çalışmada sefoksitin dirençli *K.pneumoniae*'deki BA-CA pozitifliğinin doğrudan doğruya AmpC beta-laktamazı yansıttığı belirtilmiştir<sup>(34)</sup>. Bir araştırmada tarama testinde sefopodoksim ve sefoksitin dirençli 26 *E.coli* izolatında Phoenix otomatize sistemi, CA ve E-test ile GSBL, BA ile AmpC beta-laktamaz araştırılmış, PCR'la dizi yapılmıştır. Phoenix otomatize sistemle 26 izolatın 2'si, E-testle 9'u, CA ile 15'i GSBL pozitif çıkarken dizi analizi sonucunda 26 izolatın sadece 7'inde GSBL pozitif bulunmuş, yanlış GSBL pozitif çıkan izolatlarda ya AmpC ya da AmpC ile birlikte TEM-1 geni saptanmıştır. Aynı çalışmada BA-CA testi ile sefopodoksim ve sefoksitine dirençli 26 izolatın 23'ü pozitif bulunduğu halde dizi analizinde sadece 20'i AmpC pozitif bulunmuş, diğer üçü BA-CA testi ile yanlış pozitif sonuç vermiştir. Ayrıca BA-CA ile negatif çıkan üç suşun ikisinde hem AmpC hem de GSBL genleri birarada iken üçüncü izolatta sadece AmpC (CMY-2) geni bulunmuştur<sup>(38)</sup>. Bir çalışmada, sadece GSBL, GSBL+AmpC, sadece AmpC beta-laktamaz ve aşırı miktarda kromozomal AmpC beta-laktamaz sentezleyen Gram negatif 100 izolata BA-CA ile inhibisyona dayalı MİK testi uygulanarak GSBL ve AmpC araştırılmıştır. Buna göre sadece CA ile yapılan GSBL testine BA ilavesinden sonra GSBL pozitifliği, BA ile yapılan AmpC testine CA ilavesinden sonra da AmpC pozitif suş oranı artmıştır. GSBL araştırmasında CTX-CA ve CAZ-CA kombinasyonu veya CTX-CA ve AZT-CA kombinasyonu birlikte kullanıldığında sensitivite ve spesifite % 100 olarak bulunmuştur. AmpC beta-laktamaz negatif 25 izolat sadece BA (CTX-BA ve CAZ-BA) ile test edildiğinde sırasıyla % 16 ve % 12 oranında yanlış AmpC beta-laktamaz pozitif sonuç vermiş, fakat BA-CA ile hiçbirinde yanlış AmpC pozitif sonuç alınmadığı bildirilmiştir<sup>(24)</sup>.

**4.7.4. GSBL+AmpC beta-laktamaz üreten izolatlarda CA'ya BA ilavesi ile GSBL tayini yapılan çalışmalar:** Bir çalışmada sefoksitin dirençli 122 suşta GSBL ve AmpC beta-laktamaz varlığı araştırılmış, CA ile GSBL negatif bulunan 2 suş BA eklendikten sonra GSBL pozitif olarak bulunmuştur<sup>(41)</sup>. Türkiye'de yapılan çalışmada çift disk sinerji testi ile 159 *E.coli* izolatının % 52'inde, *Klebsiella* spp. izolatlarının % 18'inde

GSBL pozitif olarak bulunurken BA ilave edildiğinde bu oranlar *E.coli*'de % 56'ya, *Klebsiella* spp.'de % 22'ye çıkmıştır<sup>(1)</sup>.

4.7.5. GSBL+KPC (*K.pneumoniae* karbapenemazı) pozitif izolatlarda CA'ya BA ilavesi ile GSBL tayini yapılan çalışmalar: Bazı çalışmalarda, sınıf A'da bulunan KPC enzimlerinin GSBL, kinolon ve aminoglikozid direnç genleri ile birlikte plazmidlerle taşındığı gösterilmiş ve bu karbapenemazların tıpkı AmpC enzimleri gibi BA ile inhibisyon özelliğinden yararlanılarak karbapenemaz üreten izolatlarda GSBL araştırılmıştır. GSBL negatif izolatlarda KPC enzimi klavulanata duyarlı olduğu için yanlış GSBL pozitif sonuç verdiği halde<sup>(22)</sup> CTX-M tipi GSBL ile birlikte iken CA'ile yanlış GSBL negatif sonuç verdiği bildirilmiştir<sup>(44)</sup>. KPC enzimi bulduran *K.pneumoniae* izolatlarında bazı porin proteinlerinin düşük düzeyde sentezlendiği saptanmıştır. Bu enzimler porin kaybı ile birlikte görüldüğü için antibiyogramda sefoksitine dirençli görülürler, oysa transkonjugantlarında sefoksitine duyarlıdır<sup>(50)</sup>. Yunanistan'da 118'i GSBL pozitif, 37'i GSBL negatif olan ve dizi analizleri sonucunda karbapenemaz tespit edilen 155 suşta CA ile, BA-CA ile inhibisyon testi, çift disk sinerji testi, modifiye edilmiş çift disk sinerji testi (CTX-BA, CAZ-BA, FEP-CA, AZT-BA disklerinden 20-30 mm uzaklığa AMC-BA diskleri yerleştirilerek yapılan) ile GSBL araştırılmıştır. PCR-GSBL pozitif izolatlarda CA ile GSBL araştırıldığında sensitivite % 66.9 olarak bulunmuş ancak BA ilavesiyle tekrarlandığında sensitivite % 100 olarak bulunmuştur. CLSI'nin önerdiği çift disk sinerji ile 118 GSBL pozitif izolatın sadece 8'inde GSBL pozitif bulunmuş, modifiye çift disk sinerji testi ile tekrarlandığında ise sensitivite % 98.3, spesifite % 100 olarak bulunmuştur<sup>(44)</sup>.

4.7.6. AmpC enzim tipleri ile bakteri cinsleri arasındaki ilişkiler: Bazı AmpC enzim tipleri *E.coli*'de sık bulunurken bazıları *Klebsiella* spp.'de daha sık bulunmaktadır. Örneğin, Kore'de yapılan bir çalışmada, DHA-1 enzimi *E.coli*'de düşük (% 8.6), *Klebsiella* spp.'de yüksek (% 76.2) oranda saptanırken, CMY-2 enzimi ise tersine *E.coli*'de yüksek % 32.7, *Klebsiella* spp.'de düşük (% 0.8) oranda tespit edilmiştir<sup>(27)</sup>. Tayvan'da toplanan 291 *E.coli* ile 282 *K.pneumoniae* izolatında GSBL

ve AmpC beta-laktamaz araştırılmıştır. Bu çalışma sonunda *E.coli* izolatlarında CMY-2 AmpC beta-laktamazı ile CTX-M ve SHV-5 GSBL'ların, *K.pneumoniae* izolatlarında ise DHA-1 AmpC beta-laktamazı ile SHV-5 GSBL'ların birarada bulunduğu gösterilmiştir<sup>(49)</sup>. Bir çalışmada *K.pneumoniae*'de SHV, CIT, DHA grubu yaygınken *E.coli*'de TEM ve CTX-M tipi GSBL yaygın olarak bulunmuş, ayrıca sefoksitin dirençli *K.pneumoniae*'deki BA-CA pozitifliğinin doğrudan doğruya AmpC beta-laktamazı yansıttığı belirtilmiştir<sup>(34)</sup>. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yapılan çalışmada CIT grubu AmpC beta-laktamazların hepsi *E.coli* izolatlarında bulunurken tüm EBC grubu AmpC enzimleri *Klebsiella* spp. ve *Enterobacter cloacae*'de tespit edilmiştir<sup>(25)</sup>. Yine Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde CIT grubu AmpC pozitif *E.coli* izolatlarında % 100 oranında saptanırken, *Klebsiella* spp.'de % 50 oranında bulunmuştur. EBC grubuna *E.coli* izolatlarında hiç rastlanmazken, *Klebsiella* spp.'de % 50 oranında saptandığı bildirilmiştir. Böylece indüklenebilir AmpC beta-laktamaz (EBC ve DHA) tespitinde *K.pneumoniae*'nin, CIT grubu AmpC beta-laktamaz tespitinde *E.coli*'nin önemli olduğu rapor edilmiştir<sup>(10)</sup>.

4.7.7. AmpC pozitif izolatlarda GSBL prevalansı: ABD'de 2000-2002 yılları arasında yapılan bir çalışmada AmpC beta-laktamaz (FOX grubu) sentezleyen 28 *K.pneumoniae* izolatının % 61'inde GSBL pozitif bulunmuştur<sup>(31)</sup>. Çin'de 2008 yılında yapılan çalışmada, AmpC beta-laktamaz üreten 54 (*Klebsiella* spp., *E.coli*) izolatının % 68.5'inde<sup>(26)</sup>, Hacettepe Üniversitesi'nde, AmpC beta-laktamaz üreten 7 (*Klebsiella* spp., *E.coli*) izolatın % 14.2'inde<sup>(1)</sup>, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve Yüksek İhtisas Hastanesinden toplanan AmpC beta-laktamaz üreten 43 (*E.coli*, *K.pneumoniae*) izolatın % 58.1'inde GSBL enzimi bulunduğu bildirilmiştir<sup>(10)</sup>.

4.7.8. Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli suşlarda görülen beta-laktamaz prevalansı ve çeşidi: ABD'de yapılan çalışmada, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli 408 *K.pneumoniae* izolatının % 58'inde GSBL, % 11'inde AmpC beta-laktamaz, % 2'inde GSBL+AmpC beta-laktamaz, % 1'inde KPC tespit edilirken % 32'inde hiçbirini tespit

edilmemiştir<sup>(30)</sup>. Türkiye’de yapılan çalışmada sefoksitin dirençli 96 (*K.pneumoniae* ve *E.coli*) izolatın 18’inde sadece AmpC beta-laktamaz, 25’inde GSBL+AmpC beta-laktamaz, 27’inde sadece GSBL görülmüş, 26’ında hiçbiri görülmemiştir<sup>(10)</sup>.

**4.7.9.** AmpC beta-laktamaz tiplerinin dünyadaki dağılımı: ABD’de yapılan çalışmada, 70 farklı hastaneden toplanan seftazidim dirençli 752 izolatta AmpC beta-laktamazlardan ACT-1 en sık oranda bulunurken<sup>(2)</sup> aynı ülkede bir yıl sonra yapılan çalışmada ise, % 92.8 ile en fazla FOX-5 saptanmıştır<sup>(31)</sup>. İspanya’da yapılan bir çalışmada, 77 izolatın 19’unda (% 24.7) PCR’la AmpC beta-laktamaz tespit edilmiş olup bunların çoğunluğu CMY-2 olarak saptanmıştır<sup>(29)</sup>. Çin’de yapılan bir çalışmada sefoksitin dirençli 327 izolatın 54’ünde (% 16.5) AmpC beta-laktamaz saptanmıştır. Bunların çoğunun DHA-1 enzimi olduğu görülmüştür<sup>(28)</sup>. Yine Çin’de yapılan bir çalışmada sefoksitin dirençli 637 *K.pneumoniae* ve 494 *E.coli* izolatında DHA-1 % 93.2 ile en fazla oranda bulunmuştur<sup>(15)</sup>. Polonya’da yapılan çalışmada 71 *Proteus mirabilis* izolatının % 20.5’inde genetik olarak *Citrobacter freundii*’nin kromozomal AmpC genine benzerlik gösteren yeni bir AmpC beta-laktamaz geni tespit edilmiş ve CMY-38 olarak adlandırılmıştır. Bu enzim geni enterik bakteriler içinde sadece *P.mirabilis* suşlarından izole edilmiştir<sup>(19)</sup>. Kanada’da yapılan 3 yıllık sürveyans çalışmasında, sefoksitin dirençli 408 *E.coli* izolatının 125’inde (% 34) AmpC beta-laktamaz tespit edilmiştir. Bu izolatların tümünde CMY-2 olduğu saptanmıştır<sup>(34)</sup>. Akdeniz üniversitesinde yapılan bir çalışmada, sefoksitine dirençli bulunan 27’si *E.coli*, 14’ü *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 41 klinik izolatta AmpC beta-laktamaz araştırılmıştır. Yirmiyedi *E.coli* izolatının 2’inde CMY-2 benzeri enzim saptanırken, *Klebsiella* spp. suşlarında AmpC beta-laktamaz saptanmadığı bildirilmiştir<sup>(14)</sup>. Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde 2006-2008 yılları arasında seftazidim dirençli 553 izolatta tespit edilen 16 AmpC pozitif izolatın 10’unda (% 62.5) EBC grubu, 4’ünde CIT (% 25) grubu, 1’inde (% 6.2) MOX grubu, 1’inde FOX (% 6.2) grubu AmpC beta-laktamaz bulunduğu bildirilmiştir<sup>(25)</sup>. Yüksek İhtisas Hastanesinde saptanan 22 AmpC

pozitif izolatın 20’inde (% 91) CIT grubu AmpC, 1’inde (% 4.5) CIT+MOX grubu AmpC, 1’inde (% 4.5) CIT+EBC grubu AmpC görüldüğü rapor edilmiştir. Aynı çalışmada Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde saptanan 21 AmpC pozitif izolatın 16’sında (% 76.2) CIT grubu AmpC, 5’inde (% 23.8) EBC grubu AmpC tespit edildiği bildirilmiştir<sup>(10)</sup>.

**4.7.10.** GSBL pozitif ve GSBL negatif izolatlarda AmpC prevalansı: 2003 yılında Kore’de 16 hastaneden toplanan sefoksitin dirençli 238 (*E.coli*, *K.pneumoniae*) izolatta PCR’la dizi analizi yapılarak AmpC beta-laktamaz ve GSBL varlığı araştırılmıştır. Bu çalışmada GSBL pozitif ve GSBL negatif hastalarda AmpC prevalansının eşit olduğu bildirilmiştir<sup>(27)</sup>. Türkiye’de sefoksitin dirençli GSBL pozitif 56 izolatın 25’inde (% 44.4), sefoksitin dirençli GSBL negatif 40 izolatın 18’inde (% 45) AmpC beta-laktamaz tespit edildiği bildirilmiştir<sup>(10)</sup>.

**4.7.11.** AmpC beta-laktamazlara bağlı semptomların GSBL’lara bağlı semptomlarla karşılaştırılması ile ilgili çalışmalar; bir çalışmada, risk faktörleri açısından anlamlı bir fark bulunmayan iki hasta grubunda (GSBL ve AmpC pozitif) klinik başarısızlık ve mortalite oranlarının benzer olduğu saptanmıştır. Sefotaksime ve seftazidime in-vitro olarak duyarlı olmasına rağmen AmpC beta-laktamaz üreten *K.pneumoniae*’nin sebep olduğu hastalara bu ilaçlar verilir 72 saat sonra değerlendirildiğinde hastaların % 51.9’unda (27 hastanın 14’ünde) klinik başarısızlık görülürken GSBL üreten *K.pneumoniae*’nin sebep olduğu hastalara bu ilaçlar verildiğinde hastaların % 56’ında (25 hastanın 14’ünde) klinik başarısızlık görülmüştür. Gerek GSBL gerekse AmpC pozitif bulunan hasta gruplarında gözlenen ölüm oranları da aynı olup 7 ve 30 gün sonraki ölüm oranları sırasıyla % 14.8 ile % 29.6 olarak saptanmıştır. AmpC beta-laktamaz tiplerinin mortalitede önemli bir faktör olduğu gözlenmiştir. Örneğin, DHA-1 tipi indüklenebilir AmpC beta-laktamaz sentezleyen izolatla infekte hastalarda 30 günde mortalite oranı % 46 iken CMY-2’de bu oran % 14.3 olarak bulunmuştur. Hem ampirik hem kesin tedavide geniş spektrumlu sefalosporin verilen DHA-1 grubu hastaların hepsi ölümlerince ampirik tedavide geniş spektrumlu sefalo-



sporin verildikten sonra imipenemle kesin tedavisi yapılan 9 hastanın 7'inde iyileşme saptanmıştır<sup>(33)</sup>. Yedi ay boyunca yapılan retrospektif çalışmada tespit edilen 22 AmpC beta-laktamaz üreticisi ile kontrol olarak seçilen 25 GSBL üreticisi *E.coli* ile infekte veya kolonize hastalarda yapılan karşılaştırmada semptomların AmpC beta-laktamaz üreticilerinde daha fazla olduğu gözlenmiştir<sup>(40)</sup>.

Sonuç olarak, bu testlerin sadece epidemiyolojik ve akademik araştırmalar için kullanılması gerektiği düşünülse de porin kaybına bağlı sefoksitin direncini AmpC enzimi varlığından ayırdetmek gerekir. AmpC'nin kesin tanısı için en güvenilir yöntem moleküler yöntemler olmakla birlikte laboratuvarında uygulanması zor ve pahalı yöntemlerdir. İndüklenebilir AmpC beta-laktamaza sahip izolatların neden olduğu infeksiyonlarda mortalite oranı daha fazla görüldüğü için tüm Gram negatif izolatların İBL (indüklenebilir beta-laktamaz) yönünden tetkik edilmesi gerekir. İndüklenebilir AmpC beta-laktamazların farklı indükleyici ve sefalosporinlerle farklı sonuç vermesi nedeniyle tüm Gram negatif izolatların kuvvetli indükleyici olarak sefoksitin ve klavulanatın birlikte kullanıldığı indüksiyon testi ile taranması gerekir. *E. coli*'de CIT grubu AmpC beta-laktamazların, *K.pneumoniae*'de ise en çok indüklenebilir AmpC beta-laktamazlardan EBC ve DHA grubunun görülmesi nedeniyle bu iki cins bakterinin indikatör olarak kullanılması uygundur. Ancak biyokimyasal özellikleri *E. cloacae*'ye çok benzerlik gösteren *K. pneumoniae* izolatlarının doğru bir şekilde identifikasyonu yapıldıktan sonra teste alınması gerekir. Çünkü tür tanımı yanlış yapıldığında yanlış İBL pozitif sonuç alınabilir. Bu nedenle tür tanımı yapılamıyorsa ticari kitlerle tanımlamanın yapılması en iyisidir.

BA disk testi, GSBL doğrulama testine benzeyen uygulaması ve yorumu kolay bir testtir. Hem GSBL hem de AmpC beta-laktamaz tespitinde BA-CA ile kombine edilerek kullanıldığında sensitivitesi artmaktadır. Rutin laboratuvar uygulamasında, beta-laktamaz tür tayini için önerilebilecek bir algoritma; antibiyogramla eşzamanlı olarak sefoksitin ve amoksisilin-klavulanat diski ile bir ön taramayı takiben, bu antibiyotiklere dirençli suşlar için CLSI'in öner-

diği GSBL doğrulama testine BA ekleyerek AmpC ve GSBL bakılmasıdır. Sefoksitin duyarlı ACC araştırması için de amoksisilin-klavulanat ve sefalosporinlerden herhangi birine dirençli izolatlar seçilmeli, AmpC konfirmasyonu için sefoksitin yerine seftazidim ve sefotaksimle kombine BA-CA testi yapılmalıdır. Böylelikle GSBL veya AmpC açısından yanlış negatif sonuçun verilmesi, buna bağlı olarak üçüncü kuşak sefalosporinlere yanlış olarak duyarlı olduğunun bildirilmesi ile tedaviye yönelik hatalar önlenebilir.

Hastanelerde yatan hastalarda görülen antibiyogram sonuçlarındaki benzerlik mikrobiyologlar tarafından alarm olarak değerlendirilmeli ve YBÜ'den başlanarak sürveyans çalışması yapılmalıdır<sup>(10)</sup>.

## KAYNAKLAR

1. Ak S. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti, *Uzmanlık Tezi*, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara (2008).
2. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States, *Antimicrobial Agents Chemother* 2004;48(2):533-7. PMID:17112770
3. Arora S, Bal M. AmpC beta-lactamase producing bacterial isolates from Kolkata Hospital, *Indian J Med Res* 2005;122(3):224-33. PMID:16910916
4. Babini GS, Danel F, Munro SD, Micklesen PA, Livermore DM. Unusual tazobactam sensitive AmpC beta-lactamase from two *Escherichia coli* isolates, *J Antimicrob Chemother* 1998;41(1):115-8.
5. Bauernfeind A, Stempling I, Jungwirth R, Giamarellou H. Characterization of the plasmidic beta-lactamase CMY-2, which is responsible for cephamycin resistance, *Antimicrob Agent Chemother* 1996;40(1):221-4.
6. Black JA, Moland ES, Thomson KS. AmpC disc test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in Enterobacteriaceae lacking chromosomal AmpC beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 2005;43(7):3110-3. PMID:15491323
7. Black JA, Thomson KS, Buynak JD, Pitout JD. Evaluation of beta-lactamase inhibitors in disk

- tests for detection of plasmid mediated AmpC beta-lactamases in well-characterized clinical strains of *Klebsiella* spp., *J Clin Microbiol* 2005; 43(8):4168-71.  
PMid:1432735
8. Black JA, Thomson KS, Pitout JD. Use of beta-lactamase inhibitors in disk tests to detect plasmid-mediated AmpC beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 2004;42(5):2203-6.
  9. Brenwald NP, Jevons G, Andrews J, Ang L, Fraise AP. Disc methods for detecting AmpC beta-lactamases producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *J Antimicrob Chemother* 2005;56(3):600-1.  
PMid:11712782
  10. Coşkun S. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti, Doktora tezi, A.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara (2011).  
PMid:9176791
  11. Coudron PE. Inhibitor based methods for detection of plasmid mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *J Clin Microbiol* 2005;43(8):4163-7.  
PMid:10972347
  12. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC beta-lactamases, *J Clin Microbiol* 2003;41(2):772-7.  
PMid:11695759
  13. Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center, *J Clin Microbiol* 2000;38(5):1791-6.
  14. Demirbakan H, Midilli K, Ögünç D et al. Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı saptanan *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzim tiplerinin araştırılması, *Mikrobiyol Bul* 2008;42(4):545-51.  
PMid:16137496
  15. Ding H, Yang Y, Lu Q et al. The prevalence of plasmid mediated AmpC beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from five childrens hospitals in China, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27(10):915-21.  
PMid:16914114
  16. Doi Y, Shibata N, Shibayama K et al. Characterization of a novel plasmid mediated cephalosporinase (CMY-9) and its genetic environment in an *Escherichia coli* clinical isolate, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(8):2427-34.
  17. Doi Y, Paterson DL. Detection of plasmid-mediated class C beta-lactamases, *Int J Infect Dis* 2007;11(3): 191-7.  
PMid:12076323
  18. Gür D. Beta-laktamazlar, *Hacettepe Tıp Derg* 2002; 33(2):102-9.  
PMid:17826304
  19. Empel J, Baraniak A, Literacka E et al. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in Enterobacteriaceae isolates from Polish hospitals, *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52(7):2449-54.  
PMid:15772596
  20. Eroğlu Ö, Cömert FB, Külah C, Aktaş E. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi, *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2007;37(2):76-84.  
PMid:11271627
  21. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC beta-lactamase detection in Enterobacteriaceae, *J Med Microbiol* 2011;60(Pt 6):715-21.  
PMid:1381431
  22. Jacoby GA, Walsh KE, Walker VJ. Identification of extended spectrum, AmpC and carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* by disk tests, *J Clin Microbiol* 2006;44(6):1971-6.
  23. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases, *Clin Microbiol Rev* 2009;22(1):161-82.  
PMid:12581382
  24. Jeong SH, Song W, Kim JS, Kim HS, Lee KM. Broth microdilution method to detect extended spectrum beta-lactamases and AmpC-type beta-lactamase in Enterobacteriaceae isolates by use of clavulanic acid and boronic acid as inhibitors, *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3409-12.
  25. Koldaş K. Gram negatif bakterilerde plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti, *Uzmanlık Tezi*, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ankara (2009).
  26. Lee K, Hong SG, Park YJ et al. Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005;53(4):319-23.
  27. Lee K, Lee M, Shin JH et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia*

- coli and *Klebsiella pneumoniae* in Korea, *Microb Drug Resist* 2006;12(1):44-9.  
PMid:8183579
28. Li Y, Li Q, Du Y et al. Prevalence of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in a Chinese University Hospital from 2003 to 2005: First report of CMY-2 type AmpC beta-lactamase resistance in China, *J Clin Microbiol* 2008;46(4):1317-21.  
PMid:16475695
  29. Mirelis B, Riveara A, Miró E, Mesa RJ, Navarro F, Coll P. A simple phenotypic method for differentiation between acquired and chromosomal AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Enferm Infect Microbiol Clin* 2006;24(6):370-2.  
PMid:17608758
  30. Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals, *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(12):3837-42.
  31. Moland ES, Hanson ND, Black JA, Hossain A, Song W, Thomson KS. Prevalence of newer beta-lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002, *J Clin Microbiol* 2006;44(9):3318-24.
  32. Nasim K, Elsayed S, Pitout JD, Conly J, Churc DL, Gregson DB. New method for laboratory detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *J Clin Microbiol* 2004;42(10):4799-802.
  33. Pai H, Kang CI, Byeon JH et al. Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agent Chemother* 2004;48(10):3720-8.
  34. Park SD, Uh Y, Lee G, Lim K, Kim JB, Jeong SH. Prevalence and resistance patterns of extended spectrum and AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Salmonella* serovar Stanley in a Korean tertiary hospital, *APMIS* 2010;118(10):801-8.
  35. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, *J Clin Microbiol* 2002;40(6):2153-62.
  36. Pitout JD, Gregson DB, Church DL, Laupland KB. Population based laboratory surveillance for AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli*, Calgary, *Emerg Infect Dis* 2007;13(3):443-8.
  37. Reisbig MD, Hossain A, Hanson ND. Factors influencing gene expression and resistance for gram - negative organisms expressing plasmid - encoded AmpC genes of Enterobacter origin, *J Antimicrob Chemother* 2003;51(5):1141-51.
  38. Robberts FJ, Kohner PC, Patel R. Unreliable extended-spectrum beta-lactamase detection in the presence of plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli* clinical isolates, *J Clin Microbiol* 2009;47(2):358-61.
  39. Shahid M, Malik A, Agrawal M, Singhal S. Phenotypic detection of extended-spectrum and AmpC beta-lactamases by a new spot-inoculation method and modified three-dimensional extract test: comparison with the conventional three-dimensional extract test, *J Antimicrob Chemother* 2004;54(3):684-7.
  40. Sidjabat HE, Paterson DL, Qureshi ZA et al. Clinical features and molecular epidemiology of CMY-type beta-lactamase producing *Escherichia coli*, *Clin Infect Dis* 2009;48(6):739-44.
  41. Song W, Jeong SH, Kim JS et al. Use of boronic acid disk methods to detect the combined expression of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases and extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., and *Proteus mirabilis*, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 57(3):315-8.
  42. Taneja N, Rao P, Arora J, Dogra A. Occurrence of ESBL and AmpC beta-lactamases and susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI, *Indian J Med Res* 2008;127(1):85-8.
  43. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA et al. Identification of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results, *J Clin Microbiol* 2009;47(2):294-9.
  44. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase possessing Enterobacteriaceae, *J Clin Microbiol* 2009;47(11):3420-6.
  45. UK National Guidelines for Laboratories. Detection and characterisation of beta-lactamase resistance in Gram negative bacteria of veterinary significance. Issued by the Veterinary and Public Health Test Standardisation Group A Subgroup of the UK Surveillance Group for Disease and Infections of Animals (SGDIA) 2005.
  46. Wang QT, Liu YM, Wang H, Sun HL, Chen MJ, Du XL. Plasmid mediated cephalosporinase among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2004;43(7):487-90.
  47. Winokur PL, Brueggemann A, DeSalvo DL et al. Animal and human multidrug-resistant, cepha-

- losporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase, *Antimicrob Agent Chemother* 2000; 44(10):2777-83.
48. Yagi T, Wachino J, Kurokawa H et al. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol* 2005;43(6):2551-8.
49. Yan JJ, Hsueh PR, Lu JJ et al. Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan, *Antimicrob Agent Chemother* 2006;50(5):1861-4.
50. Yiğit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrob Agent Chemother* 2001; 45(4):1151-61.