

# Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae izolatlarında AmpC beta laktamaz sıklığının belirlenmesi ve tespit yöntemlerinin karşılaştırılması

## Identifying the frequency of AmpC beta-lactamase Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates and comparison of detection methods

Ahmet Balıkcı

Sureyyapasa Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim Araştırma Hastanesi.  
İletişim: balikciahmet@gmail.com

### ÖZET

Bu çalışmanın amacı altın standart olarak PZR yöntemini kullanarak klinik izolatlardan üreyen E.coli ve K. pneumoniae suşlarında plazmid ile kodlanmış AmpC beta-laktamazın araştırılması ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamazların saptanması için sefoksitin-Hodge testinin ve kloksasilin inhibisyon testinin etkinliğinin karşılaştırılmasıdır.

İki yıl boyunca 3,450 hastanın klinik izolatlarından sefoksitine dirençli 22 E.coli ve 18 K. pneumoniae suşu toplanmıştır. Disk difüzyon testinde sefoksitin dirençli olan suşlara AmpC geni varlığının araştırılması amacı ile MOX,CIT, EBC, FOX, DHA, EBC primerleri kullanılarak multipleks PZR uygulanmıştır. AmpC geni tesbit edilen suşlar Sefoksitin-Hodge testi ve kloksasilin inhibisyon testi ile fenotipik olarak incelenmiştir.

40 izolattan dokuzu, GSBL üretimini teyit eden klavulanik asit tarafından, altısı ise kloksasilin tarafından inhibe edildi, dokuzu sefoksitin-Hodge testi ile pozitif saptandı. Dört izolat, kombinasyon halinde GSBL ve AmpC beta-laktamaz ekspresine etti. AmpC beta-laktamaz genleri PZR ile incelenmiş, 40 sefoksitine dirençli izolattan 11 tanesinin plazmid aracılı AmpC beta laktamaz sentezlediği görülmüştür (Beş E.coli ve altı K. pneumoniae). 11 izolattan iki CIT, iki EBC, altı FOX, bir izolatta hem FOX ve EBC tipi gen saptanmıştır. İki fenotipik tarama yöntemi kappa analizi ile karşılaştırılmış, Hodge testi plazmid aracılı AmpC laktamazların saptanmasında rehberlerin aksine kloksasilin inhibisyon testinden daha hassas olduğu görülmüştür. Rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek daha kolay, ekonomik ve güvenilir bir fenotipik yöntem ihtiyacı olduğu tesbit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** kloksasilin AmpC, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Plazmid

### SUMMARY

The aim of this study was to look for plasmid encoded AmpC beta-lactamase producing clinical isolates of E.coli and K. pneumoniae using the PCR method as a gold standard and also compare the efficiency of cefoxitin-Hodge test and cloxacillin inhibition test for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases.

Cefoxitin resistant 22 E.coli and 18 K.pneumonia, were collected from 3,450 patient in two years period. Strains which resistant in cefoxitin disk diffusion test investigate for presence of AmpC genes by multiplex PCR using primers MOX CIT, EBC, FOX, DHA, EBC primers. Strains which were positive for AmpC genes investigated by cefoxitin Hodge and cloxacillin disc tests.

Among 40 isolates nine were inhibited by clavulanic acid confirming their ESBL production, nine were positive by cefoxitin-Hodge test, six isolates were inhibited by cloxacillin. Four isolates expressed ESBLs and AmpC. Genes encoding for six phylogenic groups acquired AmpC genes were examined by PZR. 11 out of 40 cefoxitin-resistant isolates included AmpC (Five E.coli ve six K. pneumoniae 9). Out of 11 isolates, two produced CIT-type enzymes, two EBC, six FOX and one both FOX and EBC type enzymes.

PCR method was most sensitive technique to detect plasmid-mediated AmpC lactamases. The two phenotypic screening methods were compared with kappa analysis and the Hodge test was more sensitive than the inhibition test of cloxacillin in the determination of plasmid-mediated AMPC lactamases, unlike the guidelines. It has been determined that there is a need for an easier, economical and reliable phenotypic method that can be applied in routine laboratories.

**Keywords:** AmpC, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Plasmids

## GİRİŞ

Beta laktam antibiyotiklerin kullanım alanı primer olarak Enterobacteriaceae nedenli enfeksiyonların tedavisi olarak tanımlanmıştır(1). Bu enfeksiyonlar, son yıllarda Enterobacteriaceae'nin antimikrobiyal direncindeki belirgin artışa bağlı olarak daha yaygın hale gelmiştir. Çok ilaca dirençli (MDR) gram-negatif bakteriyel enfeksiyon ile ilişkili potansiyel morbidite ve mortaliteyi önlemek için kullanılan yeni ajanlar, bu bakterilerde yeni direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olmuştur(2).

Beta laktamaz üretimi, penisilin ve sefalosporin dahil beta-laktam antimikrobiyaller için en yaygın direnç mekanizmasıdır(3). Bu nedenle, AmpC beta-laktamaz (AmpC) ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Enterobacteriaceae cinsi bakteriler kritik bir klinik sorun haline gelmiştir(4). GSBL'ler tipik olarak plazmid aracılıdır, klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilen penisilin, sefalosporin ve monobaktamlara bakteriyel direnç kazandırır(5). Diğer yandan AmpC beta-laktamaz genleri kromozomal olarak veya plazmid aracılığıyla ekspresye edilir. GSBL'lere benzer şekilde, AmpC beta-laktamazlar penisilinlere, sefalosporinlere ve monobaktamlara direnç kazandırabilirler, fakat GSBL'lerden farklı olarak bunlar aynı zamanda sefamisinlere karşı da aktiftir ve klavulanik asitle inhibe edilemezler(1,6). Plazmid ile kodlanmış AmpC genleri, plazmidler üzerine kromozomal indüklenebilir AmpC genlerinden aktarılmıştır ve tipik olarak *Klebsiella* spp. ve *E. coli* gibi AmpC genlerini ekspresye etmeyen ve şimdi önemli bir klinik tehdit olarak karşımıza çıkan, yatay gen transferi yoluyla organizmalara aktarılmıştır(7).

Kromozomal AmpC genleri, yapısal olarak düşük seviyelerde ekspresye edilir ve ekspresyonları, sefoksitin ve imipenem gibi beta-laktam antibiyotikler tarafından indüklenir(8). İndüksiyon, bir DNA bağlanma proteini, AmpR gerektirir ve indükleyici ajan kaldırıldıktan sonra tersine çevrilebilir(9). Plazmid aracılı AmpC genlerin çoğunluğu, *Escherichia coli* (*E.coli*) ve *Klebsiella pneumoniae*'in (*K.pneumoniae*) nozokomiyal izolatlarında bulunur(10). Kromozomal AmpC'lerin aksine plazmid aracılı AmpC gen ekspresyonu indüklenebilir değildir(11).

*E. coli*'de, AmpC ekspresyonunun regülasyonu diğer Enterobacteriaceae türlerinden önemli ölçüde farklıdır. *E. coli* kromozom AmpC'si, zayıf bir promotörün ve güçlü bir baskılayıcı gen bölgesinin kontrolü altında bazal seviyesinde, AmpR eksikliğinden dolayı ekspresye edilir(12-14). *E.coli*, AmpC geninin promotör bölgesinde çeşitli mutasyonlar tarif edilmiştir. Bu AmpC geninin ekspresyonuyla sonuçlanır(15-17). *E.coli*'nin aksine,

*K.pneumoniae* kromozomal AmpC geni içermez, ancak *K. pneumoniae*'nin klinik suşlarında plazmid kodlu AmpC geni de tanımlanmıştır(18).

Plazmid ile kodlanmış beta-laktamazların saptanması, klinik mikrobiyoloji için özel bir husustur. Çünkü, doğru dozda en uygun antibiyotiğin kullanılması gibi tedavi seçeneklerini etkileyebilir, böylece sadece terapötik başarısızlığı değil, aynı zamanda genişletilmiş spektrumlu AmpC beta-laktamazların ortaya çıkmasına neden olabilecek antimikrobiyal direnç için seçici baskılama da azalır(19). AmpC ifade eden organizmaların neden olduğu enfeksiyonların sayısının artması, bu direnç mekanizmasının doğru bir şekilde saptanması için bir başka aciliyet seviyesi eklediye de, GSBL'in saptanmasında olduğu gibi, plazmid kodlu AmpC'nin varlığını test etmek için standart bir fenotipik yöntem yoktur(1). Klinik laboratuvarların çoğu rutin olarak plazmid aracılı AmpC beta-laktamazı test etmez. Laboratuvarlar için en ciddi sorun, plazmid aracılı AmpC suşlarının fenotipik tespitinin zor olmasıdır ve bunlar GSBL'ler kadar kolay tanımlanamaz.

Türkiye'de plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz üreten *E.coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarıyla ilgili veri sınırlıdır. Bu çalışmada, sefoksitin-Hodge testi ve kloksasilin gibi fenotipik ve moleküler testler kullanarak *E.coli* (n=22) ve *K. pneumoniae* (n=18) izolatlarının GSBL ve plazmid ile kodlanmış AmpC beta-laktamaz üretimini inceledik.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Bakteriyel suşlar ve duyarlılık testi

Toplam 40 [*E. coli* (n=22), *K.pneumoniae* (n=18)] ardışık, tekrarlayıcı olmayan, sefoksitin dirençli klinik örnek iki yıllık bir süre boyunca 3,450 hastadan toplanmıştır (Ekim 2004- Aralık 2006). İzolatlar idrar (n=29), trakeal aspirasyon (n=4), kan (n=2), kateter (n= 2), balgam (n=1), peritoneal sıvı (n=1), vajinal sürüntü (n =1) kültürlerinden elde edilmiştir.

Türler geleneksel yöntemlerle tanımlandı. Kırk klinik izolatın 12 antimikrobiyal ajana antimikrobiyal duyarlılık paternleri, örneklerin alındığı zaman sebebiyle CLSI önerilerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerinde yapılmıştır. Test edilen ilaçlar ampisilin (10 µg), ampisilin-sulbaktam (10/10 µg), amoksisilin klavulanat (20/10 µg), amoksisilin(10 µg), seftazidim (30 µg), sefepim (30 µg), seftriakson (30 µg), sefuroksim (30 µg), siprofloksasin (5 µg), sefoksitin (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) ve sefoksitin (30 µg)'dir. *E. coli* ATCC 25922 ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 bir kontrol suşları kontrol suşu olarak kullanılmıştır. Sefoksitin zon çapları 18 mm'den az olan izolatlar sefoksitin dirençli olarak

tanımlandı. Sefoksitin direnci E test ile doğrulanmıştır. İzolatlar, klavulanik asitli veya klavulanik asitsiz (10 µg) seftazidime (CAZ) ve sefotaksim (CTX) diskleri kullanılarak GSBL üretimi yönünden test edilmiştir. Disk difüzyon testinde sefoksitin (30 µg) zon çapı 18mm küçük olan suşlar, AmpC beta laktamaz varlığının araştırılması amacıyla ileri çalışmalara alınmıştır. AmpC gen tesbiti

Genomik DNA, High Pure PZR Template Preparation Kit (Roche) kullanılarak ekstrakte edildi. 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µM MOX, CIT, DHA, FOX ; 0,5 µM ACC, EBC ; 0,4 µM primer, 1.25 Unite Taq DNA polimeraz ve 2 µl ekstrakte DNA içeren 50 µl karışım hazırlandı. PZR programı, üç dakika boyunca 94 ° C'de başlangıç denatürasyonu, ardından 30 saniye 94 ° C'de 35 döngü DNA denatürasyonu, 30 saniye 64 ° C'de primer birleşmesi ve 1 dakika boyunca 72 ° C'de primer uzaması şeklindedir . PZR ürününün beş mikrolitre alınarak, % 2 agaroz (Bio-Rad, Hercules, CA) ile jel elektroforezi ile analiz edildi. Jeller 10 µg / ml'de etidyum bromür ile boyandı ve UV transilluminasyonu ile görselleştirildi(8).

#### Modifiye Hodge testi

Mueller-Hinton agar plaklarının tüm yüzeyini kapsayacak şekilde E.coli ATCC 25922 ekilmiştir. İnoküle edilmiş agar üzerine bir 30 mg sefoksitin diski yerleştirildi. Diskin kenarından beş mm'lik dışa doğru radyal yönde steril bir bisturi bıçağı ile agar kesildi. Enzim ekstratları, santrifüjlenmiş triptik soya broth kültürlerinden sefoksitin dirençli suşlardan hazırlandı ve yarık içine inoküle edildi. Plak daha sonra gece boyunca 35° C'de inkübe edildi. Bakterinin yarığın inhibisyon bölgesini kestiği noktadaki çoğalması pozitif bir test sonucu olarak kabul edildi ve AmpC beta-laktamazın varlığı için kanıt olarak yorumlanmıştır.

#### Kloksasilin İnhibisyon Testi

Muller-Hinton plak kloksasilin (250 µg / ml) içeren ve içermeyen bir 30 µg sefotaksim diski yerleştirildi. Plaklar, 35 °C'de gece boyunca inkübe edildikten sonra CTX etrafındaki inhibisyon zonu kloksasilin diskine doğru genişlemesi AmpC tipi beta-laktamaz varlığı yönünde yorumlanmıştır.

## BULGULAR

Kırk E.coli ve K. pneumoniae izolatında plazmid aracılı AmpC laktamaz ve GSBL varlığını araştırıldı. Klavulanik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılarak, 40 suştan dokuzunun ( %22,5) GSBL ürettiğini saptanmıştır. GSBL üreten izolatların üçü K. pneumoniae ve altısı E.coli idi. 40 izolat, Hodge

ve kloksasilin inhibisyon testleri ile plazmid aracılı AmpC laktamazların varlığı için daha ileri test edilmiştir. Dokuz E.coli suşu Hodge testinde pozitif sonuç vermiştir. Altısı kloksasilin içermeyen kontrol plaklarınıninkine kıyasla (250 µg / ml) kloksasilin içeren plaklarda 30 µg sefotaksim disk varlığında 10 mm'den daha büyük bir inhibisyon zonu sergiledi ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz ekspresyonu yönünden pozitif kabul edildi. Kloksasilin tarafından inhibe edilen altı suş, dokuz Hodge-pozitif suş ile aynı idi. Üç izolat, kombinasyon halinde GSBL ve AmpC beta-laktamaz ekspresyonunda (Tablo 1). Sefoksitine dirençli 40 izolatın 11'inde AmpC geni (Beş E.coli (% 23), altı K. pneumoniae (% 33) saptandı. Bu 11 suştan iki izolat CIT tipi enzim, ikisi EBC, altısı FOX, bir FOX ve EBC enzim birlikteliği tesbit edildi MOX, DHA, ACC tipi enzimleri ekspresyon eden izolatlar tespit edilmemiştir (Tablo 1).

Tablo 1 : PCR pozitif suşların genel özellikleri, moleküler ve fenotipik yöntem sonuçları

Suşlar (K:Klebsiella pneumoniae,E: E.coli)	Hasta örneği	Yaş, cinsiyet	PCR	Plazmid	Konjugasyon	Kloksasilin	Hodge test
K1	Hemokültür	2/ Erkek	CIT	+	+	-	+
E1	İdrar	18/ Erkek	CIT	+	+	+	+
K2	İdrar	10/ Kadın	FOX	+	-	-	-
K3	Trakeal kateter	90/ Erkek	FOX	+	+	+	+
K4	Vajinal sürüntü	-/ Kadın	FOX	+	-	+	+
E2	İdrar	2/ Kadın	FOX	-	-	+	+
E3	Dren sıvısı	3/ Kadın	FOX	-	-	+	+
E4	İdrar	73/ Erkek	FOX	+	-	-	-
K4	İdrar	73/ Erkek	EBC	+	-	-	+
K5	Balgam	78/ Erkek	EBC	+	-	-	+
K6	Batın sıvısı	43/ Kadın	EBC	+	-	-	+
K7	İdrar	83/ Erkek	FOX+ EBC	+	+	+	+

## TARTIŞMA

GSBL ve AmpC beta-laktamaz üretimi ile ilgili direnç, Enterobacteriaceae enfeksiyonlarının tanı ve tedavisinde önemlidir. Dirençli suşların doğru tespit edilmesindeki başarısızlık genellikle terapötik başarısızlıkla sonuçlanır ve aynı zamanda çok ilaç dirençli suş oluşumuna da yol açabilirler. AmpC beta-laktamazlar ve GSBL'ler, uzun yıllardır çalışılmakla birlikte, günümüzde laboratuvarlar, GSBL ve AmpC beta-laktamaz üreten türlerin doğru tespitinde güçlük çekebilmektedirler.

Çalışma daha önce tez olarak yayınladığından, o zaman kullanılan CLSI rehberinde standard prosedürler önerilmemiştir. Ancak son kullanılan Eucast rehberinde AmpC beta-laktamaz eksprese eden organizmaların saptanması için prosedür önerilmektedir(20).

Eucast dökümanında kloksasilin ile sinerji testi *K.pneumoniae* için yeterli olduğu söylenmesine rağmen *E.coli*'deki plazmid aracılı AmpC için PZR ile doğrulama gerektiği söylenmektedir(21).

Plazmid aracılı AmpC suşlarının fenotipik tespiti çok zordur. Eucast zon çaplarına göre geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç sağlamayabilirler, bu yüzden hatalı geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı olarak rapor edilebilirler, bu da tedavi başarısızlığına neden olabilir(22-23). Bu nedenle, GSBL üretimi için doğrulama testleri negatif ancak GSBL ekspresyonundan şüphelenildiğinde, suşlar plazmid aracılı AmpC beta laktamazlarının varlığı açısından incelenmelidir.

AmpC beta laktamazlarını tespit etmek için çeşitli tarama ve doğrulama yöntemleri mevcuttur. Sefalosporinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık için tarama testleri dahil fenotipik testler belirsiz ve güvenilir olmayabilir.

Bu nedenle, izoelektrik odaklama ve multipleks PZR tekniği gibi moleküler yöntemler altın standart olarak kabul edilmiştir(24). Moleküler tekniklerdeki sorun, uygulamalarının rutin olarak zor olmasıdır, bu nedenle fenotipik bir yöntemin standartlaştırılması çok faydalı olacaktır. Bu çalışmada, yaygın olarak kullanılan iki fenotipik testin etkinliklerini karşılaştırdı (Sefoksitin-Hodge, kloxacillin inhibisyon).

Verilerimiz sefoksitin-Hodge ve kloksasilin inhibisyon testlerinin her birinin spesifik olarak AmpC-beta laktamazı saptadığını göstermektedir. 11 PZR doğrulanmış suştan sadece altısını tanımlayan, kloksasilin testine göre 11 PZR doğrulanmış suşun dokuzunu AmpC pozitif olarak tanımlayan sefoksitin-Hodge testi daha duyarlı görünmektedir.

Türkiyede AmpC beta-laktamaz üreten *E.coli* ve *K. pneumoniae* izolatı bildirilmiştir. 2008 yılında Demirbakan ve ark'a6 göre 41 sefoksitine dirençli *E.coli* (n=27) ve *K. pneumoniae* (n = 14) izolatlarından sadece iki *E.coli* suşunun multipleks PZR ile plazmid bazlı AmpC genlerini içerdiğini; Bir AmpC enzimi üreten CIT suşu ve bir CTX suşu tesbit etmişlerdir.

Daha yakın zamanda yapılan bir başka çalışmada, plazmid aracılı AmpC beta-laktamazların varlığı, multipleks PZR ile 50 sefoksitin dirençli *E.coli* (n=42) ve *K. pneumoniae* (n=8) izolatlarının 22'sinde CIT, birinde CIT + EBC ve bir suşta CIT + MOX + GSBL tesbit edilmiştir(24). Çalışmamızda 40 sefoksitine dirençli *E.coli* (n = 22) ve *K. pneumoniae* (n=18) izolatlarının

11'inde plazmid aracılı AmpC laktamaz (Beş *E.coli*, altı *K. pneumoniae*). 11 izolattan ikisi CIT tipi enzim, ikisi EBC, altısı FOX, biri FOX ve EBC tipi enzimlerden oluşmuştur.

FOX ve CIT enzimlerinin en yaygın AmpC beta laktamazlar oldukları görülmektedir.

Gene Coşkun ve Altanlar'a (25) göre üç farklı fenotipik yöntemle yaptığı çalışmada boronik asit-klavullanik asit inhibisyon testinin diğer iki teste (Tris-EDTA diski, modifiye üç boyutlu test) göre daha duyarlı olduğu görülmüştür.

## SONUÇ

Türkiye'de *E.coli* ve *K. pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz ve GSBL varlığını gözlemledik. İki test sonucu kapa analiz yöntemiyle karşılaştırıldığında kloksasilin testindeki uyum  $\kappa = 0,66$  ( $p < 0,001$ ), Hodge testindeki uyum ise  $\kappa = 0,87$  ( $p < 0,001$ ) olarak bulunmuştur. Görüldüğü üzere Eucast rehberinden farklı olarak Sefoksitin-Hodge testi, kloxacillin inhibisyon testinden daha duyarlı iken, PZR ise rehberdeki gibi plazmid bazlı AmpC beta-laktamazların belirlenmesinde en güvenilir teknik gibi görünmektedir. Çalışmamızda rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek daha kolay, ekonomik ve güvenilir bir fenotipik yöntem ihtiyacı olduğu tesbit edilmiştir.

**KAYNAKLAR**

- 1) Alain Philippon, Guillaume Arlet, George A. Jacoby. Plazmid-determined AmpC- type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2002;1-11.
- 2) A.S. Khan, S.J. Dancer, H. Humphreys. Priorities in the prevention and control of multidrug-resistant Enterobacteriaceae in hospitals. *Journal of Hospital Infection*, 2002; 85-93.
- 3) Bengtacke Jaurin, Thomas Grundstrom , Thomas Edlund, et al. The E. coli beta-lactamase attenuator mediates growth rate-dependent regulation. *Nature* 1981; 221-225.
- 4) David L. Paterson., Resistance in Gram-Negative Bacteria. *The American Journal of Medicine* 2006; 520-528.
- 5) David L. Paterson, Robert A. Bonomo. Extended-Spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 657-686.
- 6) Demirbakan H., Midilli K., Ogunc D., ve ark. Investigation of plazmid-mediated AmpC beta-lactamase types in Klebsiella spp. and Escherichia coli isolates resistant or intermediate to ceftiofloxacin. *Mikrobiyoloji Bulteni* 2008; 545-551.
- 7) Dobryan M. Tracz, David A. Boyd, Louis Bryden, et al. Mulvey. Increase in AmpC promoter strength due to mutations and deletion of the attenuator in a clinical isolate of ceftiofloxacin-resistant Escherichia coli as determined by RT-PZR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2005; 768-772
- 8) F. Javier Perez-Perez. Nancy D. Hanson. Detection of Plazmid-Mediated AmpC beta-Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PZR. *Journal of Clinical Microbiology* 2002; 2153-2162.
- 9) George A. Jacoby. AmpC beta-lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2009; 161-182.
- 10) Guilene Barnaud, Guillauma Arlet, Charlotte Verdet, et al. Salmonella enteritidis: AmpC Plazmid-Mediated Inducible  $\beta$ -Lactamase (DHA-1) with an AmpR Gene from Morganella morganii. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998; 2352-2358.
- 11) Guilene Barnaud, G., Roger Labia., Laurent Raskine. Extension of resistance to cefepime and ceftiofloxacin associated to a six amino acid deletion in the H-10 helix of the cephalosporinase of an Enterobacter cloacae clinical isolate. *FEMS Microbiology Letters* 2001; 185-190.
- 12) Kenneth S. Thomson., Controversies about Extended-Spectrum and AmpC beta-lactamases. *Emerging Infectious Diseases* 2001; 333-336.
- 13) L. K. Siu, Po-Liang Lu, J.-Y. Chen, et al. High-level expression of AmpC beta-lactamase due to insertion of nucleotides between 10 and 35 promoter sequences in Escherichia coli clinical isolates: cases not responsive to extended-spectrum-cephalosporin treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003; 2138-2144.
- 14) Louis B. Rice, Robert A. Bonomo. beta-lactamases: which ones are clinically important?. *Drug Resistance Updates* 2000 ; 178-189.
- 15) Michael A. Pfaller, and John Segreti. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 153-163.
- 16) Michael R. Mulvey, Elizabeth Bryce, David A. Boyd, et al. Molecular characterization of ceftiofloxacin-resistant Escherichia coli from Canadian hospitals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2005 ; 358-365.
- 17) Nadine Honore, Marie Helene Nicolas, Stawart T. Cole. Inducible cephalosporinase production in clinical isolates of Enterobacter cloacae is controlled by a regulatory gene that has been deleted from Escherichia coli. *The EMBO Journal* 1986; 3709-3714.
- 18) Nancy D. Hanson. AmpC  $\beta$ -lactamases: what do we need to know for the future? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 2-4.
- 19) Nancy D. Hanson, Christine C. Sanders. Regulation of inducible AmpC  $\beta$ -lactamase expression among Enterobacteriaceae. *Current Pharmaceutical Design* 1999; 881-894.
- 20) CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approve Standard M100-S20. Wayne:ABD;2011
- 21) EUCAST Klinik ve/veya epidemiyolojik önemi olan direnç mekanizmaları ve direnç özelliklerini saptama kılavuzu. Versiyon 2.0, 2017.
- 22) Philip E. Coudron, Ellen S. Moland, Kenneth S. Thomson. Occurrence and detection of AmpC $\beta$ -lactamases among Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, and Proteus mirabilis isolates at a veterans medical center. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38:1791-1796.
- 23) Ronald N. Jones., Important and emerging  $\beta$ -lactamase-mediated resistances in hospital-based pathogens: the AmpC enzymes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 1998; 461-466.
- 24) S. Peter-Getzlaff, S. Polsfuss, M. Poledica, et al. Detection of AmpC Beta-Lactamase in Escherichia coli: Comparison of Three Phenotypic Confirmation Assays and Genetic Analysis. *Journal of Clinical Microbiology* 2011; 2924-2932.
- 25) Serpil Coskun, Nurten Altanlar , Sefoksitine Dirençli Escherichia coli ve Klebsiella Pneumoniae Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Tespiti. *Mikrobiyoloji Bulteni* 2012; 375-385.