



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**



**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
GRAM NEGATİF ENTERİK BAKTERİLERDE  
KARBAPENEMAZ VARLIĞININ VE TİPLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hüseyin Haydar KUTLU**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Ebru US**

**2015-ANKARA**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
GRAM NEGATİF ENTERİK BAKTERİLERDE  
KARBAPENEMAZ VARLIĞININ VE TİPLERİNİN  
ARAŞTIRILMASI**

**Hüseyin Haydar KUTLU**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Ebru US**

**Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi  
tarafından 13L3330015 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**2015-ANKARA**

## **KABUL VE ONAY**

## İÇİNDEKİLER

|                                                       |      |
|-------------------------------------------------------|------|
| KABUL VE ONAY .....                                   | ii   |
| İÇİNDEKİLER .....                                     | iii  |
| ŞEKİLLER .....                                        | vi   |
| ÇİZELGELER .....                                      | viii |
| ÖNSÖZ.....                                            | x    |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....                  | xii  |
| 1. GİRİŞ .....                                        | 1    |
| 2. GENEL BİLGİLER.....                                | 3    |
| 2.1. Karbapenem Grubu Antibiyotikler.....             | 3    |
| 2.1.1. Tarihçe .....                                  | 3    |
| 2.1.2. Kimyasal yapı.....                             | 4    |
| 2.1.3. Etki mekanizması .....                         | 4    |
| 2.1.4. Mikrobiyolojik aktivite .....                  | 5    |
| 2.2. Karbapenem direnci.....                          | 6    |
| 2.2.1. Dış membran proteinleri.....                   | 7    |
| 2.2.2. Penisilin bağlayan proteinler (PBP'ler).....   | 9    |
| 2.2.3. Beta-laktamazlar.....                          | 9    |
| 2.3. Karbapenemazlar .....                            | 11   |
| 2.3.1. Sınıf A Karbapenemazlar .....                  | 12   |
| 2.3.2. Sınıf B karbapenemazlar .....                  | 16   |
| 2.3.3. Sınıf D karbapenemazlar .....                  | 20   |
| 2.4. Karbapenemaz saptanması .....                    | 21   |
| 2.4.1. Modifiye Hodge testi.....                      | 29   |
| 2.4.2. İnhibitör tabanlı testler .....                | 30   |
| 2.4.3. Karbapenem içeren kromojenik besiyerleri ..... | 34   |
| 2.4.4. Carba NP testi .....                           | 35   |
| 2.4.5. Moleküler yöntemler .....                      | 36   |
| 3. GEREÇ VE YÖNTEM .....                              | 39   |

|                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi ve Tiplendirimi.....                                         | 39  |
| 3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....                                                          | 39  |
| 3.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi .....                                                        | 40  |
| 3.2.2. GSBL aranması.....                                                                             | 43  |
| 3.2.3. Gradyent difüzyon test yöntemi .....                                                           | 45  |
| 3.3. Modifiye Hodge testi .....                                                                       | 46  |
| 3.3.1. Gereç .....                                                                                    | 46  |
| 3.3.2. Yöntem.....                                                                                    | 47  |
| 3.4. Multipleks PZR için Bakterilerden DNA Eldesi .....                                               | 49  |
| 3.4.1. Gereç .....                                                                                    | 49  |
| 3.4.2. Yöntem.....                                                                                    | 50  |
| 3.5. Multipleks PZR Yöntemi ileKarbapenemaz Genlerinin Araştırılması... 50                            |     |
| 3.5.1. Gereç .....                                                                                    | 50  |
| 3.5.2. Yöntem.....                                                                                    | 52  |
| 3.6. <i>Pulsed Field</i> Jel Elektroforezi (PFGE) .....                                               | 57  |
| 3.6.1. Gereç .....                                                                                    | 58  |
| 3.6.2. Yöntem.....                                                                                    | 60  |
| 3.7. Verilerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme .....                                           | 65  |
| 4. BULGULAR.....                                                                                      | 67  |
| 4.1. Bakteri İzolatlarının Genel Özellikleri.....                                                     | 67  |
| 4.2. Bakteri İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Varlığı ve Sıklığı.....                            | 69  |
| 4.3. Bakteri İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları ve Karbapenemaz Genleri ile İlişkisi..... | 75  |
| 4.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi .....                                                        | 75  |
| 4.3.2. GSBL Aranması.....                                                                             | 85  |
| 4.3.3. Gradyent Difüzyon Testi.....                                                                   | 86  |
| 4.4. Modifiye Hodge Testi Sonuçları.....                                                              | 89  |
| 4.5. <i>Pulsed Field</i> Jel Elektroforezi (PFGE) Sonuçları.....                                      | 91  |
| 4.5.1. <i>K. pneumoniae</i> İzolatları için PFGE Sonuçları .....                                      | 91  |
| 4.5.2. <i>E. coli</i> İzolatları için PFGE Sonuçları .....                                            | 99  |
| 4.5.3. <i>E. cloacae</i> İzolatları için PFGE Sonuçları .....                                         | 101 |
| 4.5.4. <i>E. aerogenes</i> İzolatları için PFGE Sonuçları.....                                        | 102 |
| 4.5.4. <i>K. oxytoca</i> İzolatları için PFGE Sonuçları.....                                          | 102 |
| 5. TARTIŞMA .....                                                                                     | 104 |

|                                  |            |
|----------------------------------|------------|
| <b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b> | <b>119</b> |
| <b>ÖZET.....</b>                 | <b>123</b> |
| <b>SUMMARY .....</b>             | <b>125</b> |
| <b>KAYNAKLAR .....</b>           | <b>127</b> |

## ŞEKİLLER

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2. 1. Farklı $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin bisiklik çekirdeklerinin kimyasal yapıları.....                                 | 4  |
| Şekil 2. 2. Sınıf A karbapenemazlardaki hidrojen bağ ağını gösteren şema.....                                                             | 13 |
| Şekil 2. 3. Sokak tipi <i>K. pneumoniae</i> suşlarının meropenem için MİK değerlerinin dağılımı .....                                     | 24 |
| Şekil 2. 4. Sokak tipi <i>K. pneumoniae</i> suşlarının disk difüzyon metodu ile elde edilen meropenem zon çapı değerlerinin dağılımı..... | 25 |
| Şekil 2. 5. Karbapenemaz üreticilerinin saptanmasına yönelik algoritma.....                                                               | 28 |
| Şekil 2. 6. EUCAST'e göre inhibitör tabanlı testler ile karbapenemaz saptama algoritması.....                                             | 31 |
| Şekil 3. 1. 100 mm'lik Mueller Hinton agar plağında gerçekleştirilen modifiye Hodge testi .....                                           | 48 |
| Şekil 4. 1. İncelenen örneklerin kliniklere göre dağılımı.....                                                                            | 67 |
| Şekil 4. 2. Örnek türlerine göre dağılım.....                                                                                             | 68 |
| Şekil 4. 3. Örneklerden izole edilen bakterilerin türlere göre dağılımı.....                                                              | 69 |
| Şekil 4. 4. OXA-48 üreten izolatların bakteri türlerine göre dağılımı .....                                                               | 70 |
| Şekil 4. 5. OXA-48 üreticilerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı.....                                                         | 72 |
| Şekil 4. 6. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı .....                                    | 74 |
| Şekil 4. 7. Enterobacter türlerinde PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı .....                                               | 75 |
| Şekil 4. 8. İzolatların karbapenem ve sefalosporin grubu antimikrobiyaller için duyarlılık kategorileri.....                              | 76 |
| Şekil 4. 9. İzolatların monobaktam, aminoglikozit, kinolon ve diğer antimikrobiyaller için duyarlılık kategorileri.....                   | 77 |
| Şekil 4. 10. Klebsiella türleri için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları .....                                                      | 78 |
| Şekil 4. 11. <i>E. coli</i> izolatları için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları .....                                               | 78 |
| Şekil 4. 12. Enterobacter türleri için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları.....                                                     | 79 |

|                                                                                                           |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Şekil 4. 13. Ertapenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı....                      | 81  |
| Şekil 4. 14. İmipenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı.....                      | 82  |
| Şekil 4. 15. Meropenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı..                        | 83  |
| Şekil 4. 16. Doripenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı ...                      | 84  |
| Şekil 4. 17. GSBL pozitif izolatların bakteri türleri içindeki dağılım yüzdeleri.....                     | 85  |
| Şekil 4. 18. Gradyent difüzyon yöntemi ile hesaplanan ertepenem MİK değerlerinin dağılım aralıkları ..... | 86  |
| Şekil 4. 19. Gradyent difüzyon yöntemi ile hesaplanan meropenem MİK değerlerinin dağılım aralıkları.....  | 87  |
| Şekil 4. 20. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarına ait PFGE dendogramı .....                                  | 92  |
| Şekil 4. 21. Pulsotip A’da yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları.....            | 95  |
| Şekil 4. 22. Pulsotip B’de yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları.....            | 97  |
| Şekil 4. 23. Pulsotip C’de yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları.....            | 99  |
| Şekil 4. 24. <i>E. coli</i> izolatlarına ait PFGE dendogramı .....                                        | 100 |
| Şekil 4. 25. <i>E. cloacae</i> izolatlarına ait PFGE dendogramı.....                                      | 101 |
| Şekil 4. 26. <i>E. aerogenes</i> izolatlarına ait PFGE dendogramı.....                                    | 102 |
| Şekil 4. 27. <i>K. oxytoca</i> izolatlarına ait PFGE dendogramı.....                                      | 103 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 2. 1. Gram negatif bakterilerdeki ana $\beta$ -laktamaz grupları .....                                                                         | 11 |
| Çizelge 2. 2. Avrupa kılavuzuna (EUCAST, 2015) göre <i>Enterobacteriaceae</i> için karbapenem duyarlılık sınır değerleri .....                         | 22 |
| Çizelge 2. 3. Amerika kılavuzuna (CLSI, 2015) göre <i>Enterobacteriaceae</i> için karbapenem duyarlılık sınır değerleri .....                          | 22 |
| Çizelge 2. 4. Ana karbapenemazları eksprese eden <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin karbapenemler için MİK değerleri dağılımı.....                   | 23 |
| Çizelge 2. 5. Karbapenemaz üreten <i>Enterobacteriaceae</i> için klinik sınır değerler ve tarama sınır değerleri (EUCAST metodolojisine göre) .....    | 25 |
| Çizelge 2. 6. Ana karbapenemazları eksprese eden GSBL pozitif veya negatif <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarında direnç profilleri .....             | 27 |
| Çizelge 2. 7. Difüzyon yöntemleriyle yapılan inhibitör-tabanlı fenotipik testlerin yorumlanması.....                                                   | 34 |
| Çizelge 3. 1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotiklerin <i>Enterobacteriaceae</i> için duyarlılık zon çapları (CLSI, 2015)..... | 42 |
| Çizelge 3. 2. EUCAST (2015) ve CLSI (2015) kılavuzlarına göre <i>Enterobacteriaceae</i> için ertapenem ve meropenem MİK değerleri.....                 | 46 |
| Çizelge 3. 3. Karbapenemaz genlerinin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri .....                                                             | 53 |
| Çizelge 4. 1. Karbapenemaz genlerinin türler arasında dağılımı .....                                                                                   | 71 |
| Çizelge 4. 2. Karbapenemaz genlerinin yoğun bakım üniteleri ve yoğun bakım dışı bölümler arasındaki dağılımı.....                                      | 72 |
| Çizelge 4. 3. Bakteri türlerinin antimikrobiyal ajanlara direnç yüzdeleri.....                                                                         | 80 |
| Çizelge 4. 4. Ertapenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve gradient difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....          | 88 |
| Çizelge 4. 5. Meropenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve gradient difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması.....          | 88 |

|                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 4. 6. Karbapenemaz geni pozitif/negatif bulunan izolatlarda modifiye Hodge testi (0,05 McFarland) ile alınan sonuçlar..... | 89 |
| Çizelge 4. 7. Değişik karbapenemaz genleri için modifiye Hodge testinin (0,05 McFarland) duyarlılık yüzdeleri .....                | 90 |
| Çizelge 4. 8. Karbapenemaz geni pozitif/negatif bulunan izolatlarda modifiye Hodge testi (0,5 McFarland) ile alınan sonuçlar.....  | 90 |
| Çizelge 4. 9. Değişik karbapenemaz genleri için modifiye Hodge testinin (0,5 McFarland) duyarlılık yüzdeleri .....                 | 91 |
| Çizelge 4. 10. Farklı pulsotiplerdeki <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımı .....                            | 93 |
| Çizelge 4. 11. Farklı pulsotiplerdeki <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının antibiyotik direnç profilleri.....                        | 94 |

## ÖNSÖZ

Gram negatif bakterilerde  $\beta$ -laktamaz aracılı antimikrobiyal direnç, sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların yanı sıra toplum kökenli enfeksiyonlarda da karşımıza çıkmaktadır. Mikroorganizmalarda direnç mekanizmalarının çeşitlilik kazanması, farklı bakteriler arasında aktarımı ve hızla yayılması, tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamaktadır. Bu noktada karbapenem grubu antibiyotikler, elimizdeki en önemli tedavi seçeneklerinden biri olmaktadır. Fakat karbapenemaz enzimi üreten mikroorganizmaların ortaya çıkması ve yaygınlaşması sonucunda, bu tedavi seçeneği bazen devre dışı kalmaktadır.

Ülkemizde karbapenemaz enzimi üreten mikroorganizmalar da giderek yaygınlaşmaktadır. Bazı karbapenemaz genleri uzun yıllardır bildirilirken bazıları yeni yeni saptanmaya başlamıştır. Bunların yaygınlık kazanmasından endişe duyulmaktadır.

Çalışmamızda, karbapenem direnci gösteren gram negatif enterik bakterilerin hem yaygın görülen hem de nadir olarak karşımıza çıkan karbapenemaz genleri açısından araştırılması ve ülkemize ait epidemiyolojik veri elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu arada ampirik tedavi şemalarına yol göstermek amacıyla mikroorganizmaların antibiyotik direnç profilleri de belirlenmiştir.

Uzmanlık eğitimim süresince gerek tez ve diğer akademik çalışmalarında, gerekse rutin laboratuvar hizmetleri ile ilgili bilgi ve deneyim kazanmamda, bilgi ve tecrübelerini daima yanımda hissettiğim tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Ebru Us'a;

Derin bilgisi ve motive edici sözleri ile profesyonel gelişimime büyük katkılar yapan, destek ve anlayışını esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mehmet Kıyan'a;

Akademik çalışmalarımın her aşamasında karşılaştığım güçlükleri aşmamda bilgi ve yardımına başvurduğum, her seferinde de bilgi ve desteğini esirgemeyerek önümü açan Sayın Prof. Dr. Alper Tekeli'ye;

Bilgi, ilgi ve yardımseverlikleriyle eğitimim boyunca desteklerini eksik etmeyen, her zaman rehberliklerine başvurduğum Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof. Dr. A. Murat Aksoy'a, Sayın Prof. Dr. Fikret Şahin'e, Sayın Prof. Dr. T. Murat Özsan'a, Sayın Prof. Dr. Devran Gerçek'er'e, Sayın Prof. Dr. Z. Ceren Karahan'a, Sayın Prof. Dr. G. İstar Dolapçı'ya, Sayın Prof. Dr. Aydın Karaaslan'a ve Sayın Doç. Dr. Gülay Aral Akarsu'ya;

Çalışmam sırasında, bu konudaki deneyimlerini benimle paylaşan ve verdikleri kontrol suşlarıyla çalışmamı yapmama önemli katkı sağlayan Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Prof. Dr. J. Sedef Göçmen'e, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Dolunay Gülmez Kıvanç'a,

4 yıllık uzmanlık eğitimim sırasında birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, İbn-i Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm personele,

Uzun soluklu ve emek gerektiren bu eğitim sürecinde fedakarlıkla bana destek veren, manevi desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili eşime, anne ve babama,

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Hüseyin Haydar KUTLU

Ankara, 2015

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

AK: Amikasin

AMC: Amoksisilin-klavulanik asit

AZT: Aztreonam

CAZ: Seftazidim

CIP: Siprofloksasin

CLSI: *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CTX: Sefotaksim

CZ: Sefazolin

DOR: Doripenem

ECOFF: *Epidemiological cut-off* (epidemiyolojik sınır değeri)

EDTA: Etilen diamin tetraasetat

ETP: Ertapenem

FEP: Sefepim

GES: *Guiana extended-spectrum*

GIM: *German imipenemase*

GN: Gentamisin

GSBL: Genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz

IMI: *Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -laktamase*

IMP: İmipenem

KPC: *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

LEV: Levofloksasin

MBL: Metallo- $\beta$ -laktamaz

MEM: Meropenem

MHA: Mueller Hinton agar

MHT: Modifiye Hodge testi

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

$\mu$ L: Mikrolitre

$\mu$ m: Mikrometre

$\mu$ mol: Mikromol

$\mu$ M: Mikromolar

NDM: *New Delphi Metallo- $\beta$ -Laktamaz*

NMC: *Not metallo-enzyme carbapenemase*

OMP: Dış membran proteini

PBP: Penisilin bağlayan protein

PFGE: *Pulsed field* jel elektroforezi

PTA: *Probability of target attainment*

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

SIM: *Seoul imipenemase*

SME: *Serratia marcescens enzyme*

SPM: *Sao Paulo metallo- $\beta$ -lactamase*

SXT: Trimetoprim-sülfametoksazol

TPZ: Piperasilin-tazobaktam

VIM: *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*

## 1. GİRİŞ

*Enterobacteriaceae* türleri arasında hızla ve artarak yayılan genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (GSBL) bu yüzyılın başından beri araştırılmaktadır. GSBL üreten suşların neden olduğu toplumsal kaynaklı enfeksiyon sıklığı artmış ve GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinden kaynaklanan enfeksiyonlar son 10 yıl içinde kontrolden çıkarak uluslararası salgınlar oluşturmaya başlamıştır (Nordmann ve Cornaglia, 2012a).

Son yıllarda *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında ortaya çıkan bakteriyel direnç mekanizması ise karbapenemaz enzimi üretimidir. Bu fenomenin de tıpkı GSBL’de olduğu gibi kısa bir süre içinde kontrolden çıkmasından ve toplum kökenli enfeksiyonlarda bile karşımıza çıkacak kadar yaygın bir hal almasından korkulmaktadır. Bu durum, dirençli gram negatif bakteri enfeksiyonlarında kullandığımız son basamak ilaçlar olan karbapenem grubu antibiyotiklerin artık kullanılamaz hale gelmesi anlamına gelmektedir (Budak ve ark., 2012; Nordmann ve Cornaglia, 2012a ve Walsh, 2010).

Her geçen gün karbapenem direncine yol açan yeni genler tespit edilmektedir. Yakın zamanda bulunan *New Delhi Metallo- $\beta$ -Laktamaz* (NDM), karbapenemazlar konusunda bilim adamlarının dikkatlerini üzerine toplamıştır (Budak ve ark., 2012). Bakterilerde yeni bulunan bu gene ve karbapenemaz enzimi salgılanmasına yol açan diğer genlere sahip suşlarda karbapenemlere karşı yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri bildirilmiş olup, bazı suşlarda polimiksinler ve glisilsiklinler dahil olmak üzere tüm antimikrobiyallere dirençli suşlar tanımlanmıştır (Walsh, 2010). Oldukça endişe verici bu tablo; karbapenemazların taranması, tespit edilmesi ve yayılımının önlenmesi gibi konularda yeni yöntemlerin geliştirilmesini ve epidemiyolojik veri toplanmasını zorunlu kılmaktadır.

Çalışmamızda karbapenem direnci gösteren gram negatif enterik bakterilerin hem yaygın görülen hem de nadir olarak karşımıza çıkan karbapenemaz genleri

açısından fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması ve ülkemize ait epidemiyolojik veri elde edilmesi; bu arada ampirik tedavi şemalarına yol göstermesi için mikroorganizmaların antibiyotik direnç profillerinin de belirlenmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karbapenem Grubu Antibiyotikler

#### 2.1.1. Tarihçe

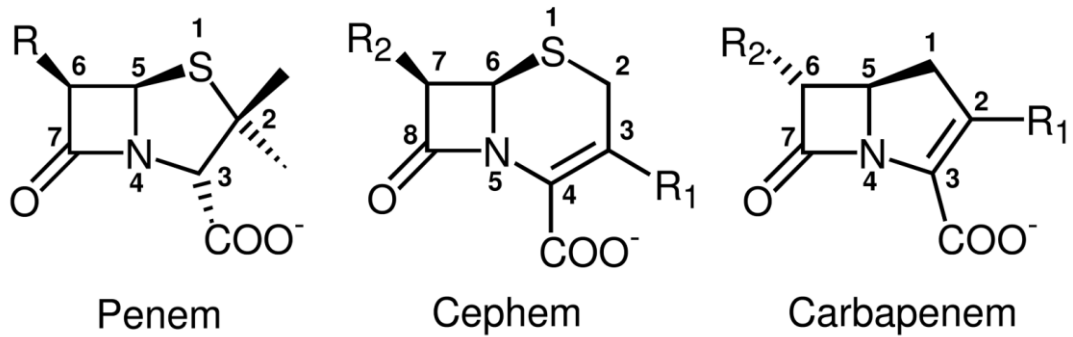
Karbapenemler, günümüzde kullanımda olan antibiyotikler arasında bilinen en geniş antibakteriyel etki spektrumuna sahip antibiyotik sınıfıdır. Bu antibiyotik grubu, ağır enfeksiyonların ya da dirençli mikroorganizmaların neden olduğu tabloların tedavisi için “son basamak antibiyotik”, başka bir ifadeyle de “eldeki son seçenek ajan” olarak bilinmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

Karbapenemler iki farklı laboratuvar tarafından (Beecham Araştırma Laboratuvarları ve Merck Sharp & Dohme Araştırma Laboratuvarları) identifiye edilmiştir. *Streptomyces olivaceus* kültüründen ilk identifiye edilen üç bileşen; MM 4550, MM 13902 ve MM 17880, olivanik asitler olarak tanımlanmıştır. Merck Sharp & Dohme Araştırma Laboratuvarları ise *Streptomyces cattleya*’dan tienamisinini izole etmiştir (Wise, 1986).

Olivanik asitler karbapenem iskeletine sahip ve geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamlar olarak fonksiyon görebilmekte iken, kimyasal yapısının kararsızlığı ve bakteriyel duvardan zayıf penetrasyonu nedeniyle daha ileri araştırmalara konu olmamıştır. Sonuçta tienamisin bütün karbapenemlerin atası ve model bileşeni olarak görev yapmıştır. Sonrasında bir seri karbapenem tanımlanmış olsa da tienamisin, bunların en önemlisidir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

### 2.1.2. Kimyasal yapı

Karbapenem grubu antibiyotiklerdeki temel yapı, penisilinin  $\beta$ -laktam halkasına benzemektedir. Ancak bu yapıda, 1. pozisyondaki sülfür yerine karbon bulunmakta ve beş üyeli halkadaki 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağ yer almaktadır. Karbapenemlerin pek çok  $\beta$ -laktamaz enzimine dayanıklılığı, hidroksietil yan zincirindeki farklı transkonfigürasyonundan kaynaklanmaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011 ve Wise, 1986) (Şekil 2.1).



**Şekil 2. 1.** Farklı  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin bisiklik çekirdeklerinin kimyasal yapıları. Penem çekirdeği, penisilinlerde yer alır ve  $\beta$ -laktam halkasıyla birleşmiş bir tetrahidrotiazol halkası içerir. Sefem çekirdeği, sefalosporinlerde yer alır ve  $\beta$ -laktam halkasıyla birleşmiş bir dihidrotiazin halkası içerir. Karbapenem çekirdeği ise  $\beta$ -laktam halkasıyla birleşmiş bir dihidrotirol halkası içerir (Oelschlaeger ve ark., 2010)

### 2.1.3. Etki mekanizması

Karbapenemler, bakteriyel hücre duvarından kolaylıkla difüze olamamaktadır. Genel olarak karbapenemler gram negatif bakterilerin içine dış membran proteinleri aracılığıyla girmektedir. Periplazmik alana ulaştıktan sonra penisilin bağlayan proteinleri (PBP) kalıcı olarak açılleyerek etkisiz hale getirmektedir. PBP'ler bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakanın sentezini katalizleyen enzimlerdir (örneğin; transglikozilazlar, transpeptidazlar ve karboksipeptidazlar). Karbapenemlerin yüksek etkinliklerini sağlayan anahtar faktörlerden biri, aynı anda

birden fazla ve farklı PBP'lere etki edebilmesidir. Hücre duvar yapımı üç boyutlu dinamik bir süreç olup bir yandan yapım, diğer taraftan otoliz gerçekleşmektedir. Halbuki karbapenemlerin varlığında PBP'ler etkisiz hale geldiğinden yapım süreci dururken otoliz devam etmekte, sonuçta da peptidoglikan tabaka zayıflayarak ozmotik basıncın etkisiyle bakteri hücresi patlamaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011).

#### 2.1.4.Mikrobiyolojik aktivite

Karbapenemler, kullarımdaki antimikrobiyaller arasında penisilinler, sefalosporinler ve  $\beta$ -laktam/ $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonlarına göre daha geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptir. Göz önüne alınacak bazı farklılıklar şu şekilde sıralanabilir:

- Ertapenem biraz daha sınırlı etki spektrumuna sahiptir; çünkü *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı imipenem ve meropenem kadar aktif değildir (Oliver ve ark., 2004).
- Meropenem, *Acinetobacter baumannii*'ye karşı imipenem ya da doripenem kadar etkili değildir (Mandell, 2009).
- Doripenem, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'ye karşı imipenem ve meropeneme göre daha düşük MİK değerlerine sahiptir (Mandell, 2009). İlave olarak doripenem, karbapenemazlar ile hidrolize karşı en az duyarlı olan karbapenemdir. Doripenemin karbapenemazlarla hidrolizi, imipeneme göre 2 ila 150 kat daha yavaştır (Queenan ve ark., 2010).
- Meropenem, klavulanik asit ile kombine edildiğinde çoklu ilaç direnci gösteren *Mycobacterium tuberculosis*'i öldürmede etkili olmaktadır (Hugonnet ve ark., 2009).

## 2.2. Karbapenem direnci

Birçok non-fermenter gram negatif bakteride (örneğin *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*), *Enterobacteriaceae* ailesinde (örneğin *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*) ve (*Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Nocardia spp.*) klinik olarak kullanılabilir çoğu karbapenemlere direnç gözlenmektedir. Bu durum toplum sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

Karbapenemlere karşı gelişen direnç mekanizmaları;  $\beta$ -laktamazların üretimi, atım (efluks) pompaları, porin ve PBP'lerin ekspresyonlarını ve/veya fonksiyonlarını değiştiren mutasyonlar olarak özetlenebilir. Bu mekanizmaların birkaçının birlikte görülmesi, *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi belli bakteriyel türlerde yüksek düzey karbapenem direncine yol açabilmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

Gram pozitif koklar ile gram negatif basillerdeki karbapenem direnci arasında önemli bir fark vardır. Gram pozitif koklarda karbapenem direnci tipik olarak PBP'lerin aminoasit dizilerindeki değişimlere ya da karbapenemlere dirençli yeni bir PBP kazanmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Halbuki gram negatiflerde porin kayıpları ve PBP değişimleri ortaya çıkabildiği gibi,  $\beta$ -laktamazların ve atım pompalarının ekspresyonu da karbapenem direncinde önemli rol almaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011).

Her mekanizmadan kısaca bahsettikten sonra  $\beta$ -laktamazlar içerisinde yer alan karbapenemazlar konusuna ayrıntılı olarak değinmek yerinde olacaktır.

### 2.2.1. Dış membran proteinleri

Dış membran proteinleri dört büyük aile olarak gruplandırılmaktadır: genel/non-spesifik porinler, substrat-spesifik porinler, kapılı porinler ve atım porinleri. Porinler 1500 daltondan düşük moleküler ağırlığa sahip moleküllerin geçişine izin vermektedir. Karbapenem direncini sağlayan ana porin aileleri genel/non-spesifik porinler, substrat-spesifik porinler ve atım pompalarıdır. Tüm karbapenemler dış membran proteinleri (OMP'ler) ile aynı şekilde etkileşmez. Bazı OMP'ler belli karbapenemlerden daha fazla etkilenmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

#### 2.2.1.1. Porinler

Atım pompaları dışındaki porinlerin yer değiştirmeleri ya da azalmış ekspresyonları, karbapenemlerin periplazmik alana geçişinin azalması ile sonuçlanmaktadır. Bu durum *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *A. baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus rettgeri*, *Shigella dysenteriae* ve *Salmonella enterica*'da görülmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

*P. aeruginosa*'nın klinikte kullanılan karbapenemlere direncine neden olan OprD değişikliklerini bir örnek olması açısından kısaca ele almak yerinde olacaktır. OprD'nin fizyolojik görevi temel aminoasitlerin taşınmasıdır. Aynı zamanda bu porinler, karbapenemlerin *P. aeruginosa* içine difüze olmakta kullandıkları ana porinlerdir. OprD, 19 diğer porinin içinde yer aldığı geniş bir ailenin üyesidir ve *P. aeruginosa*'da bulunan bu porinler % 46-57 arası benzerlik göstermektedir. Bu 19 adet porin içerisinde sekiz tanesi OprD ile daha yakın ilişkili olmasına karşın, içlerinde sadece OprD antibiyotik alımında rol oynamaktadır. OprD, porinlerin substrat-spesifik ailesinde yer almaktadır ve ilk defa tanımlanması, yokluğunda

imipenem direnci görülmesi sebebiyle olmuştur. OprD kaybı, kromozomda yer alan OprD geni mutasyonlarına ya da bu genin transkripsiyonunun down-regülasyonuna bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. İmipenem ve tüm  $\beta$ -laktamlar dipeptit yapıda olmaları itibariyle birbirine benzediğinden, OprD kaybı ile imipeneme çapraz direnç ortaya çıkmaktadır. OprD'nin dipeptitlere ve karbapenemlere bağlanmayı sağlayan 5, 7 ve 8. halkalarındaki yer değiştirmeler de imipeneme direnç ile sonuçlanmaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011).

#### 2.2.1.2. Atım pompaları

Üçlü yapıdaki protein kompleksinin bir parçası olan atım pompalarının aşırı ekspresyonuna bağlı gelişen karbapenem direnci, en sık olarak *P. aeruginosa*, *E. aerogenes* ve *A. baumannii*'de bildirilmiştir. Bu pompalar bazı karbapenemleri dışarı atabilirken diğerlerini atamamaktadırlar. Atım pompaları birkaç süperaiile olarak gruplandırılmaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011).

*P. aeruginosa*'da karbapenemlerin elimine edilmesini sağlayan atım pompaları RND (*resistance-nodulation-division*) süperaiilesine ait olup sitoplazma ile hücre dışını bağlayan kompleks bir protein yapıdan oluşmaktadır. Bu kompleks yapının üç ana bileşeni vardır: sitoplazmik membran pompası, periferik sitoplazmik membran bağlantısı ve dış membran-periplazmik kanalı ya da atım pompası. Ligandlar atım sistemine sitoplazma-membran tarafından ya da periplazma-membran tarafından girebilir ve proton itici güç ile ligand aktif olarak dışarı atılır. OprM ve OprJ *P. aeruginosa*'nın karbapenem direncinde rol alan iki atım pompasıdır. Transkripsiyonel regülatuvar proteinlerdeki mutasyonlara bağlı olarak atım pompalarının aşırı ekspresyonu sonucunda karbapenem direnci ortaya çıkabilmektedir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

### 2.2.2. Penisilin bağlayan proteinler (PBP'ler)

PBP proteinlerindeki mutasyonlar ve/veya PBP transkripsiyonundaki azalmalar da karbapenem dirençli fenotiplerin ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır. *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis* ve *Rhodococcus equi*'de PBP ekspresyonunun azalması, karbapenem direnci ile sonuçlanmaktadır. Buna ek olarak PBP'leri oluşturan aminoasitlerdeki yer değişiklikleri ya da yeni bir PBP kazanılması *Haemophilus influenzae*, *Bacillus fragilis*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium*, *P. mirabilis*, *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da karbapenem direncine yol açmaktadır (Papp-Wallace ve ark., 2011).

### 2.2.3. Beta-laktamazlar

İlk olarak 1940 yılında *Bacillus coli* (şimdiki ismiyle *E. coli*) tarafından üretilen bir enzimin, penisilinin bakteriyel hücreleri öldürme özelliğini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (Abraham ve ark., 1940). Penisilinin yaygın kullanımından önce  $\beta$ -laktamaz aktivitesini gösteren bu çalışma,  $\beta$ -laktam inaktive edici enzimlerin doğal çevrede bulunduğunu göstermiştir. Bu enzimler,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin diğer antimikrobiyallerden ayırıcı özelliği olan  $\beta$ -laktam halkasını hidrolize etmekte ve dolayısıyla bakterileri öldürme etkisini ortadan kaldırmaktadır (Bush, 2010).

Günümüzde 1000'in üzerinde farklı  $\beta$ -laktamaz enzimi tanımlanmıştır (Bush ve Fisher, 2011). Genler rutin olarak klonlanmadan ve dizi analizi (sekanslama) yapılmadan önceki dönemde  $\beta$ -laktamazlarla yapılan ilk çalışmalarda, yeni keşfedilen bir  $\beta$ -laktamaz;

- a) Proteinin izolasyonunu takiben yapılan biyokimyasal incelemelere,
- b) İzoelektrik noktasına,

- c) Substrat hidroliz ve inhibisyon özelliklerine yönelik yapılan enzim çalışmalarına göre sınıflandırılmıştır (Queenan ve Bush, 2007).

Yapılan bu fonksiyonel sınıflandırma yıllar içerisinde genişleyerek yaygın kullanım bulan bir şema halini almıştır. Bu şemada, bilinen  $\beta$ -laktamazlar dört fonksiyonel gruba ayrılmıştır. Bush ve arkadaşlarının 1989 yılında ilk olarak önerdikleri bu şema, her geçen yıl tanımlanan yeni  $\beta$ -laktamazlar nedeniyle 1995 yılında genişletilmiştir. 2009'da tekrar güncellenen şemada  $\beta$ -laktamaz enzimleri üç grup halinde hazırlanmıştır. 1995'teki şemada iyi karakterize edilmeyen enzimlerin yer aldığı dördüncü grubun üyeleri ile ilgili bilgiler arttıkça diğer üç gruptan birine dahil edilebileceği düşünülmüştür (Bush ve Jacoby, 2010).

Moleküler yapılarına göre yapılan  $\beta$ -laktamaz sınıflandırmasında ise proteinlerin aminoasit dizileri temel alınarak  $\beta$ -laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılmıştır. Aminoasit homolojisi esas alınarak yapılan bu sınıflamaya göre  $\beta$ -laktamazlardan;

- Moleküler Sınıf A, C ve D aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşıyan  $\beta$ -laktamazları içerirken;
- Moleküler Sınıf B aktif bölgelerinde çinko içeren bütün metallo-enzimleri içermektedir (Queenan ve Bush, 2007).

Bu kadar farklı ve çeşitli enzimleri sınıflandırırken her ne kadar proteinlerin yapısını esas alarak yapılan bir sınıflandırma daha kolay ve daha az tartışmalı olsa da fonksiyonel sınıflandırmanın önemli başka avantajları vardır. Fonksiyonel sınıflandırma bu kadar çeşitli enzimlerin klinik rolü ile ilişki kurma fırsatı sağlamaktadır. Örneğin farklı sınıf  $\beta$ -laktam antibiyotiklerden hangisine seçici direnç olduğunu bilmeye imkan tanımaktadır. Hiç kuşkusuz fonksiyonel gruplamalar, yapısal sınıflara göre daha subjektif olabilmektedir; fakat bir klinik izolatta gözlenen direnç profili ile spesifik bir enzimin özelliklerini ilişkilendirme açısından, hem klinisyene hem de mikrobiyoloji uzmanına daha çok yardımcı olmaktadır. Tarihsel olarak baktığımızda da klinikte her zaman için öncelikli beklenti fonksiyonellik olmuştur. Tüm bu sebeplerden ötürü bu çeşitli enzimleri hidrolitik ve inhibisyon özelliklerine göre gruplamaya devam etmek uygun görülmektedir (Bush ve Jacoby,

2010). Çizelge 2.1’de önemli  $\beta$ -laktamaz grupları ve etkiledikleri antimikrobiyaller yer almaktadır.

**Çizelge 2. 1.** Gram negatif bakterilerdeki ana  $\beta$ -laktamaz grupları (Bush, 2010)

| Fonksiyonel grup(a) | Moleküler sınıf(b) | Yaygın ismi                             | Direnç gelişen $\beta$ -laktam antibiyotik                                                |                                      |
|---------------------|--------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
|                     |                    |                                         | Primer (c)                                                                                | Sekonder(d)                          |
| 1                   | C                  | Sefalosporinaz                          | Penisilinler, sefalosporinler                                                             | Karbapenemler, monobaktamlar         |
| 2b                  | A                  | Penisilinaz                             | Penisilinler, ilk sefalosporinler                                                         | B-laktamaz inhibitör kombinasyonları |
| 2be                 | A                  | Genişlemiş spektrumlu $\beta$ -laktamaz | Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, $\beta$ -laktamaz inhibitör kombinasyonları | Yok                                  |
| 2d                  | D                  | Kloksasilinaz                           | Penisilinler (oksasilin ve kloksasilin dahil)                                             | Yok                                  |
| 2df                 | D                  | Karbapenemaz                            | Karbapenemler ve diğer $\beta$ -laktamlar                                                 | Yok                                  |
| 2f                  | A                  | Karbapenemaz                            | Tüm $\beta$ -laktamlar                                                                    | Yok                                  |
| 3                   | B                  | Metallo- $\beta$ -laktamaz              | Monobaktamlar hariç tüm $\beta$ -laktamlar                                                | Yok                                  |

a, Bush, Jacoby ve Medeiros ile Bush, Jacoby sınıflaması; b, primer aminoasit dizisine göre sınıflama; c, tek başına  $\beta$ -laktamaz üretimine bağlı direnç gelişen  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler; d, Genellikle yüksek düzey  $\beta$ -laktamaz üretimi ile atım pompası ya da porin modifikasyonlarının birlikteliğinde direnç gelişen  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler

### 2.3. Karbapenemazlar

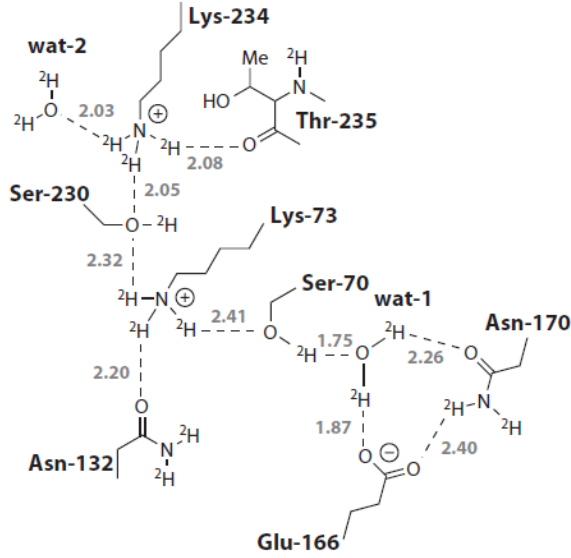
Karbapenemazlar,  $\beta$ -laktamaz ailesi içinde en geniş etki spektruma sahip enzimlerdir. Karbapenemazlar olarak bilinmesine rağmen, bazı araştırmacılar “karbapenem hidrolize eden enzimler” olarak isimlendirmeyi tercih etmektedirler.

Çünkü karbapenemler, bu enzimlerin etki ettikleri substrat spektrumunun sadece bir kısmını oluşturmaktadır. Bu enzimler, karbapenemlerin yanı sıra pek çok başka  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikleri de hidrolize edebilmekte ve mevcut birçok  $\beta$ -laktamaz inhibitörüne de direnç taşımaktadır. Fakat  $\beta$ -laktamaz literatüründe sıklıkla karbapenemaz tabiri tercih edilmektedir (Queenan ve Bush, 2007).

Ambler sınıflandırmasına göre karbapenemazlar üç ana grupta yer almaktadır: Sınıf A, Sınıf B ve Sınıf D  $\beta$ -laktamazlar.

### 2.3.1. Sınıf A Karbapenemazlar

Fonksiyonel sınıflandırmada Grup 2f'de yer alan Sınıf A serin karbapenemazların en sık rastlanan üyesi KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) olup SME (*Serratia marcescens enzyme*), IMI (*Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -laktamase*), NMC (*Not metallo-enzyme carbapenemase*) gibi başka üyeleri de vardır. İlk olarak 1980'li yıllarda tanımlanan bu enzimlerin tamamı, geniş bir spektrumda  $\beta$ -laktam hidrolizi yapabilmekte olup spektrumlarının içine karbapenemlerin yanı sıra sefalosporinler, penisilinler ve aztreonam da girmektedir ve klavulanat ile tazobaktam tarafından inhibe olmaktadır (Queenan ve Bush, 2007 ve Nordmann, 2014). Hidrolitik mekanizmaları, aktif bölgelerindeki 70. pozisyonda serin aminoasitine gereksinim duymaktadır (Şekil 2.2). Bu sınıfın dördüncü bir üyesi olarak söylenen GES  $\beta$ -laktamazlar, aslında GSBL ailesinin bir üyesi olarak tanımlanmışken, zaman içerisinde düşük ama ölçülebilir düzeyde imipenem hidrolize eden varyantlarının tespitinden sonra bu sınıfa alınmıştır (Queenan ve Bush, 2007).



**Şekil 2. 2.** Sınıf A karbapenemazlardaki hidrojen bağ ağını gösteren şema (Queenan ve Bush, 2007)

#### 2.3.1.1. KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) enzimi

Sınıf A karbapenemazlar 1980’li yıllardan beri sporadik olarak klinik izolatlardan tanımlanmakta ve çoğu kromozomal enzimler olarak bilinmekteydi. İlk olarak 1996 yılında Kuzey Karolina’da izole edilen bir izolatta plazmit üzerinde taşınan KPC-1 geni tanımlanmıştır (Yigit ve ark., 2001).

Her ne kadar ilk defa izole edildiği mikroorganizmaya atfen KPC ismi verilmiş olsa da bu enzim, farklı *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülebilmektedir (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2007).

KPC-1’in tanımlanması ile başlayan bu karbapenemaz tipinin KPC-24’e kadar farklı varyantları bildirilmiş olup (Lahey Clinic web sayfası, erişim tarihi: 14/07/2015), ülkeler ve kıtalar arası yayılım göstermiştir (Munoz-Price ve ark., 2013).

KPC karbapenemazları kodlayan genler plazmit kökenli olup hiçbir bir gen kaseti içinde yer almamakta, mobil elemanlarla ilişkili bulunmaktadır (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2007).

KPC enzimi üreten bakteriler sadece birkaç antibiyotiğe duyarlı olup bu tip organizmalarla gelişen kan dolaşımı enfeksiyonları yüksek mortalite göstermektedir. Tedavide kullanılabilecek seçenekler genellikle kolistin, tigesiklin ya da aminoglikozitlerle sınırlı olmaktadır (Munoz-Price ve ark., 2013). Yeni araştırmalarda elde edilen bulgular kolistin, tigesiklin ve meropenemin içinde bulunduğu kombine terapilerin bakteriyemik hastalarda hayatta kalma oranlarını artırabileceğini göstermektedir (Tumbarello ve ark., 2012). KPC üreten bakterilerin endemik olduğu yerlerde, ampirik tedaviler de dahil olmak üzere giderek artan orandaki kolistin kullanımının muhtemel sonucu olarak, kolistin dirençli KPC suşlarının da bildirilmeye başlanması (Bogdanovich ve ark., 2011), endişe verici bir durum olarak gözükmemektedir. Çünkü kombinasyon tedavilerinin merkezinde yer alan bir ajan olan kolistinin de kullanılamaması tehlikesi ile karşı karşıya kalılabilmektedir (Munoz-Price ve ark., 2013).

#### **2.3.1.2. GES (*Guiana extended-spectrum*) enzimi**

Daha önce Fransız Guyanası'nda (Güney Amerika) hastanede yatış hikayesi bulunan bir yenidoğanda, 1998 yılında başka bir hastanede yatışı sırasında *K. pneumoniae* türü bir suş izole edilmiştir ve GES enzimi bu suшта tanımlanmıştır. Enzime, köken aldığı yere atfen GES-1 (*Guiana extended-spectrum*) adı verilmiştir (Poirel ve ark., 2000).

Bu zamana kadar 27 varyantı bildirilmiş olan (Lahey Clinic web sayfası, erişim tarihi: 14/07/2015) GES  $\beta$ -laktamazları kodlayan genler, plazmit üzerindeki integronlarda bulunmaktadır (Queenan ve Bush, 2007). Penisilinleri ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri de içine alan geniş hidroliz spektrumuna sahip bu enzimler, başlangıçta GSBL ailesinin bir üyesi olarak sınıflandırılmıştır (Giakkoupi ve ark., 2000). Hidroliz spektrumları 2001 yılında bir klinik *P. aeruginosa* izolatında tanımlanan GES-2'nin bildirimi ile imipenemi de içerecek şekilde genişletilmiştir. Düşük ama ölçülebilir düzeyde imipenem hidrolize eden

varyantlarının tespitinden sonra GES  $\beta$ -laktamazlar, Sınıf A karbapenemazlar arasına alınmıştır (Poirel ve ark., 2001).

#### 2.3.1.3. BIC enzimi

2009 yılında Fransa’da Sen nehrinde yapılan çevresel araştırmada alınan su örneğinden izole edilen *Pseudomonas fluorescens* izolatında (PF-1) karbapenemlere direnç saptanması üzerine araştırma yapılmış ve yeni bir Sınıf A karbapenemaz olan BIC-1 tanımlanmıştır. BIC-1 geni *Serratia fonticola*’daki SFC-1  $\beta$ -laktamaz ile % 68; plazmitik KPC-2 enzimi ile %59 benzerlik göstermektedir. Penisilinleri, karbapenemleri, seftazidim hariç sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize eden bu karbapenemaz kromozomal yerleşimli olup üç ay sonra Sen nehrindeki iki diğer *P. fluorescens* suşundan da izole edilmiştir. BIC-1 geninin tüm *P. fluorescens* suşlarında bulunmaması nedeniyle bu bakteri türüne ait bir özellik olarak değerlendirilmemiştir (Girlich ve ark., 2010).

#### 2.3.1.4. Kromozomal kodlanan SME, NMC ve IMI enzimleri

SME-1 (*Serratia marcescens*enzyme), ilk olarak 1982 yılında İngiltere’de toplanan örneklerden izole edilen iki tane *S. marcescens* izolatında saptanmıştır. Bunu, Amerika’da sporadik olarak bulunan ve SME-1 ile neredeyse aynı yapıya sahip SME-2 ve SME-3 takip etmiştir. SME üreten *S. marcescens* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar, tekli izolatlar ya da en fazla 19 izolatlık küçük kümeler halinde bildirilmiştir (Queenan ve Bush, 2007).

IMI/NMC-A enzimleri (*imipenem-hydrolysing  $\beta$ -laktamase/not metallo-enzyme carbapenemase-A*), IMI ve NMC-A olmak üzere iki alt gruba ayrılmaktadır.

NMC-A enzimi, iki IMI enzimi varyantından, sekiz aminoasit yer değiştirmesi ile ayrılmaktadır (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2007). Bu enzimler Amerika'daki nehirlerde tespit edilen çevresel izolatların (Aubron ve ark., 2005) yanı sıra Amerika, Fransa ve Arjantin'de *E. cloacae* klinik izolatlarında da nadir olarak saptanmıştır (Queenan ve Bush, 2007).

Bu üç  $\beta$ -laktamazı kodlayan genler kromozomal olup mobil element bağlantısı olduğuna dair hiçbir kanıt bulunmamaktadır. Belki bu durum, bu enzimlerin nadiren karşımıza çıkmasını açıklamaya katkı sağlamaktadır. Fakat daha yeni olarak yapılan iki çalışmada Amerika'daki nehirlerden izole edilen *Enterobacter asburiae* suşlarında ve Çin'de saptanan bir *E. cloacae* suşunda IMI-2  $\beta$ -laktamaz kodlayan genlerin plazmitler üzerinde de taşınabildiği gösterilmiştir (Aubron ve ark., 2005 ve Yu ve ark., 2006).

Saflaştırılmış SME, NMC ve IMI enzimlerinin biyokimyasal karakterizasyonunda; bunların penisilinleri, erken kuşak sefalosporinleri, aztreonamı ve karbapenemleri de içine alan geniş bir hidroliz spektrumuna sahip oldukları gösterilmiştir. Bu kromozomal  $\beta$ -laktamazlar, imipenem ve sefoksitine cevap olarak indüklenebilmektedirler (Queenan ve Bush, 2007).

### 2.3.2. Sınıf B karbapenemazlar

Bu sınıftaki  $\beta$ -laktamazlar;

- Karbapenemleri hidrolize etmeleri,
- Ticari kullarımdaki  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine dirençli olmaları,
- Metal iyon şelatörleri ile inhibisyona ise duyarlı olmaları ile karakterize edilmişlerdir.

Substrat spektrumları oldukça geniştir. Bu gruptaki enzimlerin pek çoğu karbapenemlerin yanı sıra sefalosporinleri ve penisilinleri de hidrolize ederken

monobaktamları hidrolize edememeleri ile dikkat çekmektedir. Hidroliz mekanizması, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonları ile  $\beta$ -laktamlar arasındaki bağlanmalara dayandığından, iki değerlikli katyon şelatörü olan EDTA ile inhibe edilmektedir.

Bu grupta ilk saptanan ve çalışılan metallo- $\beta$ -laktamazlar (MBL), *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* ve *Stenotrophomonas maltophilia* gibi çevresel ve fırsatçı patojen bakterilerde kromozomal olarak bulunan enzimlerdir. *S. maltophilia*'yı hariç tutarsak bu bakteriler ciddi nazokomiyal enfeksiyonlarla ilişkili patojenlerden olmayıp genel olarak fırsatçı patojenlerdir ve kromozomal  $\beta$ -laktamaz genleri kolayca transfer edilememektedir.

Varlığı, direk olarak enzimi üreten türün prevalansı ile bağlantılı olan kromozomal metallo- $\beta$ -laktamazlardan başka, kazanılmış ve transfer edilebilir metallo-enzim ailelerinin saptanmasında ve yaygınlaşmasında dramatik bir artış olmuştur. Bu metallo- $\beta$ -laktamaz ailesinin en sık görülen tipleri VIM, IMP, GIM ve SIM enzimleri olup gen kasetlerine dahil olan değişik integron yapıları olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu integronlar, plazmid ya da transpozonlarla ilişkilendiğinde, bakteriler arasında kolayca transfer edilebilmektedir.

İlk keşfedilmelerinden bu yana SPM, GIM ve SIM enzimleri orijin aldıkları ülkelerden başka yerlere sıçrama göstermemişken; VIM ve IMP dünya çapında saptanmaya devam etmiştir ve bu iki metallo- $\beta$ -laktamaz için genel eğilim *P. aeruginosa*'dan *Enterobacteriaceae*'ye doğru yayılma yönünde görülmektedir (Queenan ve Bush, 2007).

Metallo- $\beta$ -laktamazlar arasında en önemlilerinden biri de NDM-1 olup 2009 yılında İsviçre'deki bir hastanın idrar kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. Çok hızlı ve dünya genelinde bir yayılım gösteren NDM üreticileri *Enterobacteriaceae*'nin yanı sıra *A. baumannii*'de, *P. aeruginosa*'da ve hatta Hindistan'daki kuyu sularında *S. maltophilia* ve kolerik vibrionlarda da görülmüştür (Nordmann, 2014; Walsh ve ark., 2011).

### 2.3.2.1. IMP (imipenemase) enzimi

IMP-1, ilk tanımlanan MBL olup 1991 yılında Japonya’da bir *S. marcescens* izolatında tespit edilmiştir (Osano ve ark., 1994). IMP-1, diğer pek çok MBL gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri (sefotaksim, seftazidim, sefepim) ve karbapenemleri de içine alacak geniş bir substrat profiline sahiptir. Sadece monobaktamları hidrolize edememektedir. IMP-1 geni, *Enterobacteriaceae* haricinde pek çok gram negatif türünde de saptanmıştır. IMP genleri sıklıkla büyük boyutlu plazmitler üzerinde yerleşmektedir (Nordmann ve Poirel, 2002).

IMP-2 geni 1997 yılında İtalya’da bir *A. baumannii* izolatında tanımlanmıştır (Riccio ve ark., 2000). IMP-3 geni ise Japonya’da izole edilen bir *Shigella flexneri* suşunda transfer edilebilir plazmit üzerinde saptanmıştır (O’Hara ve ark., 1998).

İlk tanımlandığı günden bu zamana kadar 50’nin üzerinde varyantı bildirilen IMP genleri (Lahey Clinic web sayfası, erişim tarihi: 14/07/2015) yüksek prevalansta olmasa da dünya genelinde yayılım göstermiştir (Livermore, 2012).

### 2.3.2.2. VIM (*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*)

İlk olarak 1997 yılında Verona’da (İtalya) bir *P. aeruginosa* suşunda tanımlanan VIM geni (Lauretti ve ark., 1999) daha sonra *Enterobacteriaceae*’ye, özellikle de *K. pneumoniae* türüne yayılım göstermiştir. VIM karbapenemaz üreticisi *K. pneumoniae* izolatları, KPC üreticileri kadar olmasa da dünya genelinde giderek artan sayıda raporlanmaktadır (Livermore, 2012).

Lokal salgınlar şeklinde karşımıza çıkmakla birlikte daha önemli konu, VIM geninin IncN plazmitleri aracılığıyla *K. pneumoniae* suşları arasında yaygınlaşması tehlikesidir (Garcia-Fernandez ve ark., 2011; Vatopoulos, 2008).

### 2.3.2.3. NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*)

2009 yılında biyokimyasal özellikleri IMP-1 ve VIM-2 enzimlerine benzeyen fakat VIM-1 ile sadece % 32 sekans benzerliği bulunan yeni bir MBL saptanmıştır. Bu enzim ilk defa Kuzey Avrupa’da bulunan Hindistan kökenli ya da Hindistan’a tıbbi işlemler için giden hastalardan izole edilen suşlarda tanımlanmıştır (Yong ve ark., 2009).

Bu enzim, monobaktamlar hariç tüm β-laktamlara etki etmektedir. Çoğu NDM geni barındıran suş *Enterobacteriaceae*’de tanımlanmıştır. *Acinetobacter spp.* ve daha nadir olarak *P. aeruginosa*’da NDM genine sahip suşlar bildirilmiştir ki bu iki tür; üriner sistem enfeksiyonları, peritonit, sepsis ve pulmoner enfeksiyonların da dahil olduğu ağır nosokomial enfeksiyonlara yol açmaktadır. Hindistan, Balkanlar ve Orta Doğu bölgeleri NDM üreticilerinin ana rezervuarı olarak düşünülmektedir. Tedavi seçenekleri sadece kolistin, tigesiklin ve fosfomisin gibi birkaç antibiyotikle sınırlı olduğundan NDM üreticilerinin neden olduğu hastane kaynaklı ya da toplum kaynaklı enfeksiyonları eradike etmek güç olmaktadır. Modern tıbbın etkinliğini tehdit eden bu salgının kontrol altına alınmasında enfekte hastaların ve taşıyıcıların izolasyonu ve hızlı tanı tekniklerinin kullanımı anahtar rol oynamaktadır (Dortet ve ark., 2014a).

### 2.3.2.4. Nadir MBL enzimleri

SPM-1 (*Sao Paulo metallo-β-lactamase*) ilk olarak Sao Paulo’da (Brezilya) bir *P. aeruginosa* suşundan izole edilmiştir (Toleman ve ark., 2002). İlk tanımlanmasından bu yana Brezilya’da SPM-1 geni taşıyan *P. aeruginosa* kaynaklı çok sayıda ve yüksek mortaliteli hastane salgınları ortaya çıkmıştır (Queenan ve Bush, 2007).

GIM-1 (*German imipenemase*) 2002 yılında Almanya’da izole edilmiş olup (Castanheira ve ark., 2004) VIM ile % 30, IMP ile % 43 ve SPM ile % 29 benzerlik göstermektedir. GIM-1, diğer kazanılmış metallo- $\beta$ -laktamazlar ile benzer özelliklere sahip olup beş klonal *P. aeruginosa* izolatında plazmit üzerindeki sınıf I integron üzerinde tespit edilmiştir (Queenan ve Bush, 2007).

SIM-1 (*Seoul imipenemase*) ise Kore’de tanımlanmış olup en yakın aminoasit benzerliğini IMP ailesi ile (% 64’ten 69’a kadar) göstermektedir (Lee ve ark., 2005).

İlk keşfedilmelerinden beri bu genler köken aldıkları ülkelere yayılım gösterememişlerdir (Queenan ve Bush, 2007).

### 2.3.3. Sınıf D karbapenamazlar

Sınıf D  $\beta$ -laktamazlar klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile inhibe olmazken aktiviteleri in vitro ortamda NaCl ile inhibe edilebilmektedir (Poirel ve ark., 2010). Bazı sınıf D  $\beta$ -laktamazlar karbapenemleri de hidrolize etmektedir ve OXA-48 bunun en önemli örneğidir.

Bu enzimler penisilinleri yüksek düzeyde hidrolize ederken karbapenemlere düşük düzeyde etki göstermekte ve geniş spektrumlu sefalosporinler, etki spektrumlarının dışında kalmaktadır. Geçirgenlik kayıpları ile kombine olduğunda OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticileri de yüksek düzey karbapenem direnci gösterebilmektedir. Hepsi plazmit kökenli olan bu genlere sahip izolatlar ana olarak Kuzey Afrika ve Orta Doğu ülkeleri, Türkiye ve Hindistan’da bildirilmektedir.

Çoğu OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinin, geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç göstermemesi ve karbapenemlere de sadece azalmış duyarlılık göstermesi nedeniyle fark edilmeleri ve saptanmaları zor olmaktadır. Yayılımlarını kontrol etmek ve önlemek için uygun tarama ve saptama yöntemlerine ihtiyaç olduğu gözükmemektedir (Poirel ve ark., 2012a).

## 2.4. Karbapenemaz saptanması

Karbapenemaz genleri çoğunlukla başka direnç genlerini de üzerinde barındıran ve kendi kendini konjuge edebilen plazmitler aracılığıyla yüksek aktarım oranına sahiptir. Hem antibiyotik tedavisine doğru yön verebilmek için hem de hastanede oluşabilecek bir salgın durumundan kaçınabilmek için karbapenemaz üreticilerinin hızlı ve doğru şekilde saptanmasına ihtiyaç vardır (Nordmann ve Poirel, 2013).

Karbapenemaz saptama stratejisi, öncelikle karbapenemaz taraması aşamasını, bunu takiben de fenotipik ve genotipik doğrulama adımlarını içermektedir (Stuart ve ark., 2010). Klinik bir izolatta karbapenemaz üretiminden şüphelenilmesine ilk sebep, karbapenem MİK değerlerinde artış ya da inhibisyon zon çaplarında bir azalma olmasıdır. Böyle bir izolat daha spesifik metodlar ile karbapenemaz üretimi açısından incelenmek üzere ayrılmalıdır (Miriagou ve ark., 2010).

Her karbapenemaz sınıfı için ve her tür ve izolat için MİK değerleri, diğer direnç mekanizmalarının varlığına da bağlı olarak, sokak tipi suşlardaki MİK değerlerinden başlayarak >256 mg/L'ye kadar değişen değerlere sahip olabilmektedir (Stuart ve ark., 2010).

Tarama için sınır değerler belirlenirken iki ana prensiple hareket edilmelidir:

- 1) Belirlenen sınır MİK değeri sokak tipi suşların en yüksek MİK değerinden daha yüksek olmalıdır. Aksi halde tarama testinin özgüllüğü çok düşük olacaktır.
- 2) Belirlenen MİK sınır değeri literatürde karbapenemaz geni taşıdığı gösterilen ve en düşük karbapenem MİK değerine sahip suştan daha düşük olmalıdır (Stuart ve ark., 2010).

Karbapenemaz üreticilerinde karbapenem MİK değerleri, geniş bir aralıkta dağılım göstermektedir ve bazı suşlar, güncel CLSI (2015) ve EUCAST (2015) klinik sınır değerlerine göre (Çizelge 2.2 ve Çizelge 2.3) duyarlı olarak saptanabilmektedir. Karbapenemaz saptanması için spesifik testler uygulanacak

kl nik izolatları belirleyebilmek için, karbapenemaz üreticilerinin M K dağılım aralıklarının dikkate almak gereklidir. Aynı zamanda sokak tipi mikroorganizmaların karbapenem M K değerlerinin dağılımı ve değişik direnç mekanizmalarına işaret eden direnç profilleri de bilinmelidir (Stuart ve ark., 2010).

**Çizelge 2. 2.** Avrupa kılavuzuna (EUCAST, 2015) göre *Enterobacteriaceae* için karbapenem duyarlılık sınır değerleri

| Mikroorganizma            | Karbapenem | M K sınır değeri (mg/L) |     | Zon  apı sınır değeri (mm) 10  g disk ile |     |
|---------------------------|------------|-------------------------|-----|-------------------------------------------|-----|
|                           |            | S                       | R > | S                                         | R < |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Doripenem  | 1                       | 2   | 24                                        | 21  |
|                           | Ertapenem  | 0.5                     | 1   | 25                                        | 22  |
|                           |  mipenem   | 2                       | 8   | 22                                        | 16  |
|                           | Meropenem  | 2                       | 8   | 22                                        | 16  |

M K, minimum inhibitör konsantrasyon; S, duyarlı; R, dirençli

**Çizelge 2. 3.** Amerika kılavuzuna (CLSI, 2015) göre *Enterobacteriaceae* için karbapenem duyarlılık sınır değerleri

| Mikroorganizma            | Karbapenem | M K sınır değeri ( g/mL) |     | Zon  apı sınır değeri (mm) 10  g disk ile |     |
|---------------------------|------------|--------------------------|-----|-------------------------------------------|-----|
|                           |            | S                        | R   | S                                         | R   |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | Doripenem  | 1                        | 4   | 23                                        | 19  |
|                           | Ertapenem  | 0.5                      | 2   | 22                                        | 18  |
|                           |  mipenem   | 1                        | 4   | 23                                        | 19  |
|                           | Meropenem  | 1                        | 4   | 23                                        | 19  |

M K, minimum inhibitör konsantrasyon; S, duyarlı; R, dirençli

EUCAST (2015)  nerilerine göre *Enterobacteriaceae*'de imipenem ve meropenem için M K değerleri 8 mg/L'nin üzerinde iken dirençli kabul edilirken ertapenem için bu değer 1 mg/L'nin üzeri olarak belirlenmiştir. Halbuki CLSI (2015) kılavuzunda bu değerler imipenem ve meropenem için 4  g/mL'ye eşit veya üzeri ve

ertapenem için 2 µg/mL'ye eşit veya üzeri olarak bildirilmiştir. İki kılavuz arasındaki farklılıklar sınır değeri belirlemede kullanılan değişik farmakokinetik/farmakodinamik yaklaşımlardan kaynaklanmaktadır. Her iki kılavuzda da Monte Carlo simülasyonu kullanılmakta ve serbest ilaç konsantrasyonunun, zamanın en az % 40'ında MİK değerinin üstünde olduğu hedefe erişim ihtimal değeri (*probability of target attainment*=PTA) esas alınmaktadır. EUCAST, PTA ortalama değerini belirlerken % 95 ve % 99'luk bir güven aralığı kullanırken, CLSI önerilerinde bu değer % 90 olarak seçilmiştir. Aynı zamanda CLSI, yükselmiş varyans (*inflated variance*) kullanarak değişik hasta gruplarında, özellikle de kritik hastalardaki farmakokinetik parametrelerin değişkenliklerini de dikkate almaktadır. Uyguladığı bu yaklaşımla CLSI MİK sınır değerleri, EUCAST'ın klinik sınır değerlerine göre daha yüksek sayıda karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyesi yakalamaktadır (Cantón ve ark., 2014). Fakat her iki kılavuzun belirlediği klinik sınır değerlerin altında MİK değerlerine sahip karbapenemaz üreticileri sıklıkla izole edilmektedir (Nordmann ve ark., 2012b). Özellikle OXA-48/OXA-181 üreticilerinde karbapenemler için düşük MİK değerlerine sahip suşların varlığı dikkati çekmektedir (Çizelge 2.4).

**Çizelge 2. 4.** Ana karbapenemazları eksprese eden *Enterobacteriaceae* üyelerinin karbapenemler için MİK değerleri dağılımı (Nordmann ve ark., 2012b)

| <i>Enterobacteriaceae</i>              | MİK (mg/L)             |                       |                        |
|----------------------------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
|                                        | İmipenem               | Meropenem             | Ertapenem              |
| <b>KPC (Ambler Sınıf A)</b>            | <b>0.5 ile &gt;32</b>  | <b>0.5 ile &gt;32</b> | <b>0.5 ile &gt;32</b>  |
| <b>IMP/VIM/NDM (Ambler sınıf B)</b>    | <b>0.5 ile &gt;32</b>  | <b>0.5 ile &gt;64</b> | <b>0.38 ile &gt;32</b> |
| <b>OXA-48/OXA-181 (Ambler sınıf D)</b> | <b>0.25 ile &gt;64</b> | <b>0.5 ile &gt;64</b> | <b>0.38 ile &gt;32</b> |

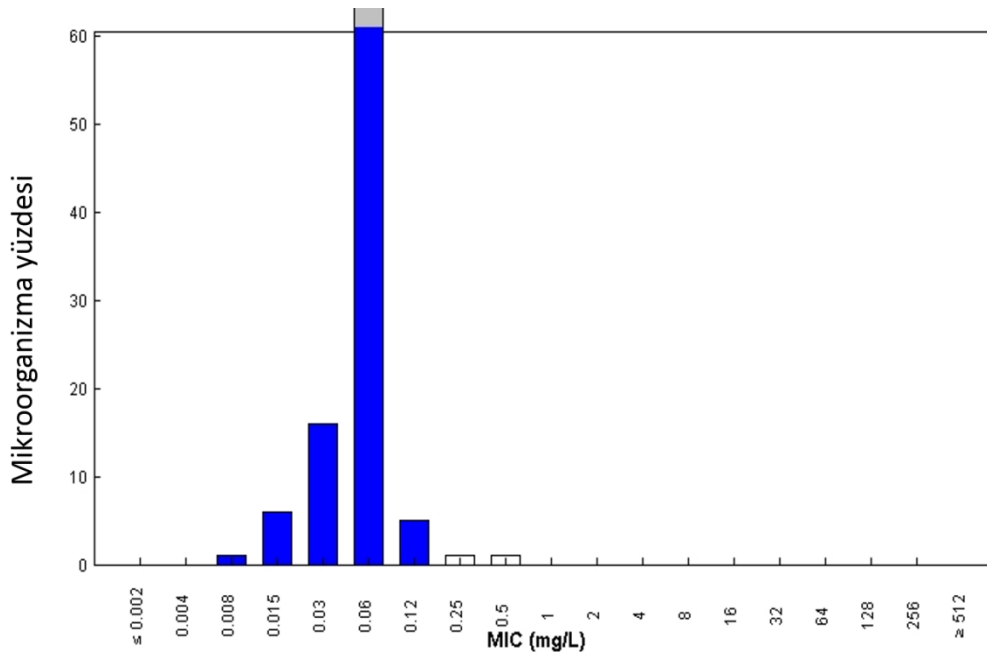
MİK, minimum inhibitör konsantrasyon

Kılavuzlardaki karbapenem klinik sınır değerlerinin altında MİK değerlerine sahip fakat karbapenemaz üretmekte olan suşları yakalayabilmek için EUCAST

tarafından belirlenen epidemiyolojik sınır değerler (ECOFF) kullanılabilir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.mic.eucast.org], erişim tarihi: 19/06/2015). ECOFF değerlerinin üstünde MİK değerlerine sahip suşlar, karbapenemaz varlığı açısından daha spesifik doğrulama testlerine alınmalıdır.

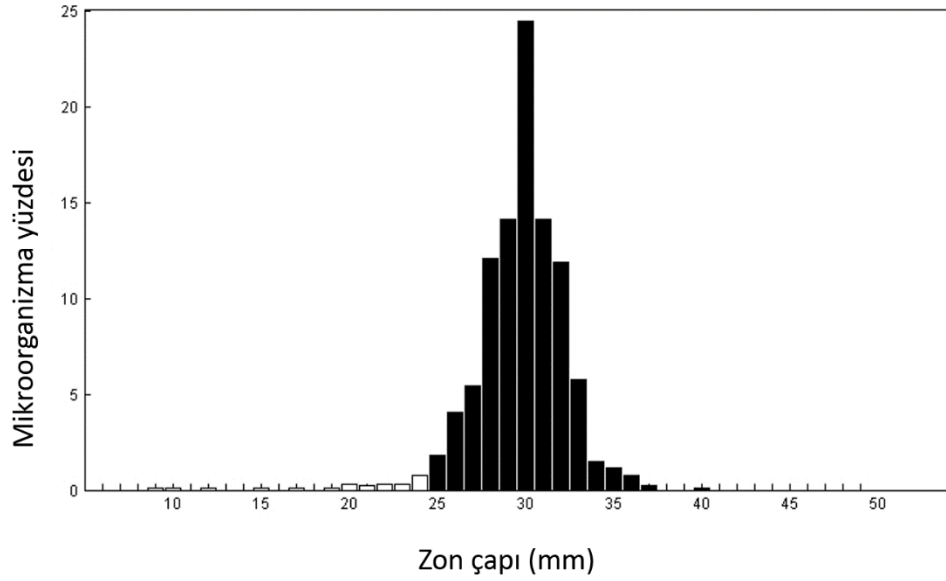
Örneğin sokak tipi *K. pneumoniae* suşlarının meropenem için MİK değerlerine dair 67 kaynaktan elde edilen 18171 örnekte, ECOFF değeri 0,125 mg/L olarak belirlenmiştir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.mic.eucast.org], erişim tarihi: 19/06/2015) (Şekil 2.3).

Şekil 2. 3. Sokak tipi *K. pneumoniae* suşlarının meropenem için MİK değerlerinin dağılımı (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.mic.eucast.org], erişim tarihi: 19/06/2015).



Dokuz veri kaynağından alınan 936 örnekte, sokak tipi *K. pneumoniae* suşlarının Kirby-Bauer disk difüzyon metodu ile elde edilen meropenem (10 µg disk) için inhibisyon zon çapı değerlerinin dağılımı incelendiğinde ECOFF değeri 25 mm olarak belirlenmiştir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.mic.eucast.org], erişim tarihi: 19/06/2015) (Şekil 2.4).

**Şekil 2. 4.** Sokak tipi *K. pneumoniae* suşlarının disk difüzyon metodu ile elde edilen meropenem zon çapı değerlerinin dağılımı (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.mic.eucast.org], erişim tarihi: 19/06/2015)



Elde edilen ECOFF değerleri doğrultusunda EUCAST, karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* için klinik sınır değerlerden başka tarama sınır değerleri de tanımlamıştır (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015) (Çizelge 2.5).

**Çizelge 2. 5.** Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* için klinik sınır değerler ve tarama sınır değerleri (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015)

| Karbapenem | MIK (mg/L) |               | Disk difüzyon zon çapları (mm) (10 µg disk ile) |               |
|------------|------------|---------------|-------------------------------------------------|---------------|
|            | S/I sınırı | Tarama sınırı | S/I sınırı                                      | Tarama sınırı |
| Meropenem  | ≤2         | >0.12         | ≥22                                             | <25           |
| İmipenem   | ≤2         | >1            | ≥22                                             | <23           |
| Ertapenem  | ≤0.5       | >0.12         | ≥25                                             | <25           |

MIK, minimum inhibitör konsantrasyon; S, duyarlı; R, dirençli

EUCAST, karbapenemaz taramasında duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan meropenemin kullanımını önermektedir. Ertapenem her ne kadar mükemmel duyarlılıkta olsa da özellikle *Enterobacter spp.* gibi türlerde, porin kaybıyla kombine

GSBL veya AmpC  $\beta$ -laktamazların varlığında, düşük stabilitesi nedeniyle özgülüğü zayıftır (Nordmann ve ark., 2012b). İmipenem ve ertapenem tarama değerlerinde, özgülüğü artırmak amacıyla yeni belirlenen ECOFF değerlerine göre bir üst MİK değeri verilebileceği bildirilmektedir. Yine kılavuzda OXA-48 üreticisi bazı suşlarda meropenem için inhibisyon zon çaplarının 26 mm'ye kadar çıkabildiği ifade edilmiştir. Dolayısıyla ülkemiz gibi OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu yerlerde meropenem tarama sınır değerinin <27 mm olarak kullanımı uygun olacaktır. İmipenemin sokak tipi suşlar ile karbapenemaz üreticilerini ayırt edebilmesi görece zayıf olduğundan karbapenemaz taramasında tek başına kullanımı önerilmemektedir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015).

CLSI (2015) kılavuzunda ise karbapenemaz üreticisi suşların güncel klinik sınır değerlere göre sıklıkla en az bir karbapenem orta duyarlı veya dirençli bulunduğu ve sıklıkla 3. kuşak sefalosporinlerden (örneğin sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, seftriakson) en az bir veya daha fazlasına dirençli olarak test edildiği belirtilmektedir. Ertapenemin orta duyarlı ya da dirençli bulunmasının karbapenemaz üreticilerini saptamada en duyarlı belirteç olduğu ifade edilmektedir.

Her iki kılavuzda da karbapenemaz üretiminin doğrulanması sadece enfeksiyon kontrolü ya da epidemiyolojik araştırma amaçlarıyla önerilmekte, karbapenemaz üreticisi olsa bile klinik sınır değerlere göre belirlenen duyarlılık kategorilerinde herhangi bir değişiklik yapılmaması gerektiği bildirilmektedir.

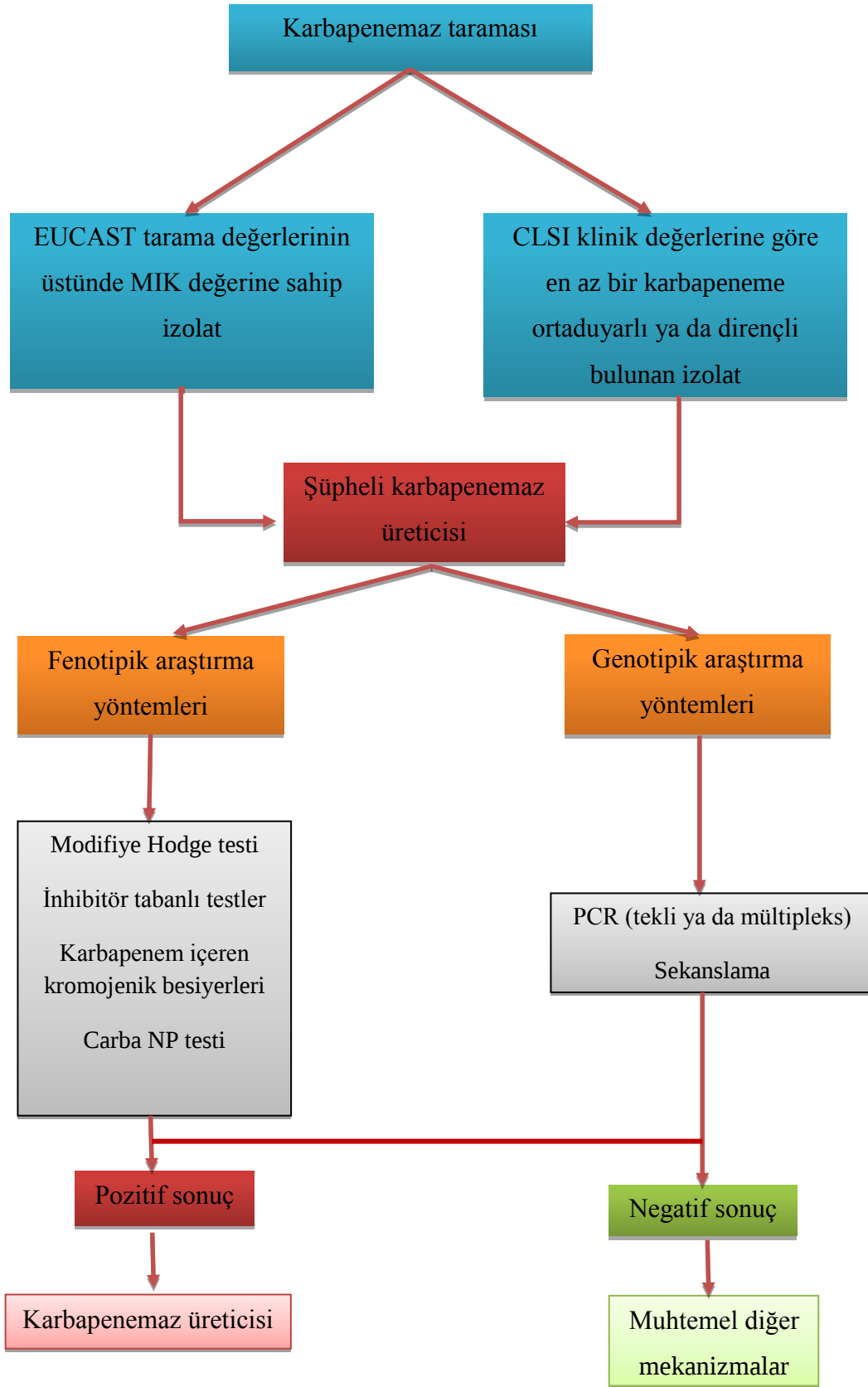
Karbapenem MİK değerlerinden ayrı olarak diğer  $\beta$ -laktam antibiyotikler için MİK değerlerinin incelenmesi de, karbapenemaz üreticisi mikroorganizmaların saptanmasında yardımcı olacaktır. Aslında bir suşun karbapenemaz üretimine sahip olması, karbapenem direnç düzeyinden bağımsız olarak birçok  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikte duyarlılık kaybıyla kendini göstermektedir. Karbapenem üreticisi bir izolat en azından penisilinlere ve dar spektrumlu sefalosporinlere direnç gösterecektir. Eğer izolat Sınıf A ya da Sınıf B karbapenemazlardan birine sahipse, seftazidim, seftriakson ve sefotaksim gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere de direnç beklenilmektedir. Halbuki bu son üç antibiyotik, Sınıf D karbapenemazların üretiminden etkilenmemektedir (Queenan ve Bush, 2007) (Çizelge 2.6).

**Çizelge 2. 6.** Ana karbapenemazları eksprese eden GSBL pozitif veya negatif *Enterobacteriaceae* izolatlarında direnç profilleri (Nordmann ve ark., 2012b)

|                    | AMX | AMC | TZP   | CTX | CAZ | IMP   | ETP | MEM   | ATM |
|--------------------|-----|-----|-------|-----|-----|-------|-----|-------|-----|
| KPC                | R   | S/I | R     | R   | R   | S/I/R | I/R | S/I/R | R   |
| KPC + GSBL         | R   | I/R | R     | R   | R   | I/R   | I/R | I/R   | R   |
| IMP/VIM/NDM        | R   | R   | I/R   | R   | I/R | S/I/R | I/R | S/I/R | S   |
| IMP/VIM/NDM + GSBL | R   | R   | I/R   | R   | R   | I/R   | R   | S/I/R | R   |
| OXA-48/OXA-181     | R   | R   | S/I/R | S/I | S   | S/I   | S/I | S/I   | S   |
| OXA-48/OXA181+GSBL | R   | R   | I/R   | R   | R   | I/R   | I/R | I/R   | R   |

AMX, amoksisilin; AMC, amoksisilin-klavulanik asit; TZP, piperasilin-tazobaktam; CTX, sefotaksim; CAZ, seftazidim; IMP, imipenem; ETP, ertapenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam

Karbapenemaz üreticilerine yönelik tarama sonrasında şüpheli bulunan bir izolatın, uygun fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Sonuçta izolat karbapenemaz üreticisi olarak tanımlanabileceği gibi karbapenem direncinin muhtemel başka mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıkması da mümkündür (Şekil 2.5).



Şekil 2. 5. Karbapenemaz üreticilerinin saptanmasına yönelik algoritma

#### 2.4.1. Modifiye Hodge testi

Modifiye Hodge testi rutin laboratuvarlarda karbapenemaz aktivitesini saptamak amacıyla yaygınlıkla kullanılan fenotipik yöntemlerden biridir (Hammoudi ve ark., 2014). İlk defa Hodge ve arkadaşları (1978) tarafından *Neisseria gonorrhea* ve diğer penisilinaz üreten bakterileri saptamak amacıyla geliştirilen testi Lee ve arkadaşları (2001) VIM-2 üreten karbapenemaz pozitif suşları saptayacak şekilde değiştirerek modifiye Hodge testini geliştirmişlerdir. Testin orijinalinde kullanılan penisilin G diski yerine imipenem (10 µg) diski, indikatör mikroorganizma olarak kullanılan penisilin G duyarlı *S. aureus* yerine de *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. Tamamı VIM-2 üreten suşlar üzerinde denenen testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla % 100 ve % 88 olarak belirlenmiştir. Kontrol olarak kullanılan farklı karbapenemaz genlerine sahip suşlarda da pozitif sonuçlar alındığından araştırmacılar testin sadece VIM-2 değil, genel olarak karbapenemaz üreticilerinin taramasında kullanılabilir bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Lee ve ark., 2001). CLSI tarafından da karbapenemaz saptamada önerilen test, kolay kullanımı ve disk difüzyon testinde kullanılan malzemeler dışında ilave bir ekipman gerektirmemesi nedeniyle laboratuvarlarda çok yaygın bir kullanım kazanmıştır.

Modifiye Hodge testi Mueller-Hinton agar kullanılarak yapılmaktadır. İndikatör organizma olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922 suşu, 0,5 McFarland standartında türbiditeye sahip olacak şekilde hazırlandıktan sonra 1:10 oranında dilüe edilerek agar plağına sürülür ve plağın merkezine bir karbapenem diski yerleştirilir. Test edilecek suş öze ile alınarak yoğun bir şekilde karbapenem diskinden başlayarak periferiye doğru bir hat boyunca sürülür. Bir gecelik inkübasyonu takiben indikatör organizmanın yonca yaprağı şeklinde karbapenem inhibisyon zonu içerisine girinti yapması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Lee ve ark., 2001).

### 2.4.2. İnhibitör tabanlı testler

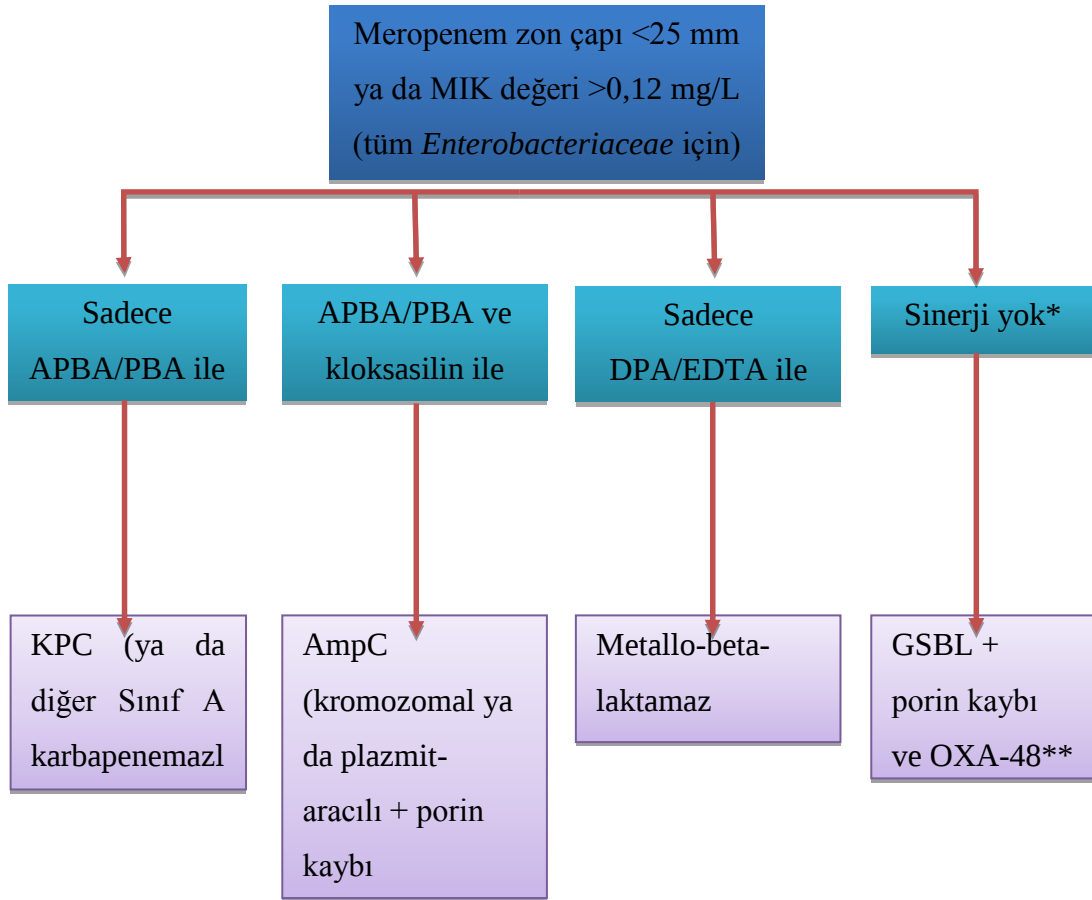
Spesifik karbapenemaz inhibitörlerinin varlığında, belirli karbapenemazların aktivitesi azalmakta ve karbapenemaz üreticileri,  $\beta$ -laktamlara daha duyarlı hale gelmektedir (Hammoudi ve ark., 2014). Bu inhibitörlerle yapılan fenotipik testlerde, tek başına karbapenem ile karbapenem-karbapenemaz inhibitör kombinasyonları karşılaştırılmakta ve inhibisyon zon çapında artış ya da MİK değerlerinde düşme olup olmaması in vitro olarak araştırılmaktadır (Stuart ve ark., 2010).

Karbapenem ile inhibitör arasındaki sinerji pratikte değişik tekniklerle doğrulanabilir:

- Kombine disk testlerinde, ticari olarak elde edilebilen inhibitör emdirilmiş karbapenem diskleri alınır. Test edilecek izolat Mueller-Hinton agara ekildikten sonra karbapenem diski ile inhibitör emdirilmiş karbapenem diski yerleştirilir. İnkübasyonu takiben zon çapları ölçülerek aralarında fark oluşup oluşmadığı incelenir (Pasteran ve ark., 2009). Aynı yöntem laboratuvar şartlarında hazırlanan karbapenem-inhibitör kombine diskleriyle de yapılabilir (Hammoudi ve ark., 2014).
- Çift disk sinerji testlerinde, steril disklerle inhibitör emdirilir ve karbapenem diskiyle aralarında belli mesafe olacak şekilde yerleştirilir. Karbapenem diski ile inhibitör arasında bir sinerji olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (Lee ve ark., 2001).
- Metallo- $\beta$ -laktamaz aktivitesini saptamak amacıyla hazırlanan imipenem ve imipenem/EDTA kombinasyonlarını içeren gradiyent difüzyon testi şeritleri kullanılabilir (Nordmann ve ark., 2012b).

Özet olarak diyebiliriz ki; Sınıf A karbapenemazlar boronik asit ile, Sınıf B karbapenemazlar dipikolinik asit ve EDTA ile inhibe olur. Sınıf D karbapenemazların rutin laboratuvarlarda kullanılan bir inhibitörü bulunmamaktadır. Kloksasilin, Amp-C  $\beta$ -laktamazları inhibe ettiğinden dolayı, AmpC aşırı üreticisi suşlar ile karbapenemaz üreticilerini ayırt etmede işe yaramaktadır (EUCAST web

sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015) (Şekil 2.6).



**Şekil 2. 6.** EUCAST’e göre inhibitör tabanlı testler ile karbapenemaz saptama algoritması (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015)

APBA, aminofenil boronik asit; PBA, fenil boronik asit; DPA, dipikolinik asit; EDTA, etilen diamin tetraasetik asit

\*KPC ile MBL kombinasyonu sinerji göstermeyebilir fakat izolatlar karbapenemlere, normale göre yüksek direnç gösterecektir.

\*\*Yüksek düzey temosilin direnci (MIK>32 mg/L, 30 µg temosilin diski ile ölçülen zon çapı <11 mm), Sınıf A ve Sınıf B karbapenemaz inhibitörleriyle sinerji yokluğunda OXA-48 üretiminin fenotipik indikatörüdür.

#### **2.4.2.1. Sınıf A karbapenemaz inhibitörleri**

KPC ve diğer Sınıf A karbapenemazların fenotipik olarak saptanmasında, boronik asit (sıklıkla 3-aminofenil boronik asit) kullanılmaktadır. İnhibisyon mekanizması bilinmemektedir. Çift disk sinerji testi ya da kombine disk testi ile test edilebilmekle birlikte kombine disk testi daha çok tercih edilmekte ve daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedir. Değişik indikatör  $\beta$ -laktamlar denenmekle birlikte meropenem ya da imipenem kullanımı tavsiye edilmektedir. Yayınlarda zon artışıyla ilgili de farklı değerler verilmektedir (Miriagou ve ark., 2010).

#### **2.4.2.2. Sınıf B karbapenemaz inhibitörleri**

Tüm metallo- $\beta$ -laktamazlar, enzim aktivitesi için sıklıkla çinko gibi divalan katyonlara, metal kofaktörler olarak ihtiyaç duymaktadır ve dolayısıyla aktif bölgelerinden çinkonun uzaklaştırılması sonucu da aktiviteleri etkilenmektedir (Walsh ve ark, 2005). Metallo- $\beta$ -laktamazların saptanmasına yönelik değişik inhibitör tabanlı testler geliştirilmiştir. Bunlar değişik metallo- $\beta$ -laktamaz inhibitörleriyle (örneğin EDTA, EDTA+1,10-fenantrolin, 2-merkaptopropionik asit, sodyum merkptoasetik asit ve dipikolinik asit) bir karbapenem ve/veya oksiiiminosefalosporin (seftazidim) arasındaki sinerjiye dayanmaktadır. Çift disk sinerji testi, kombine disk testi ya da gradiyent difüzyon testi gibi farklı yöntemlerle metallo- $\beta$ -laktamaz varlığı araştırılabilmektedir (Miriagou ve ark., 2010).

#### 2.4.2.3. Sınıf D karbapenemaz inhibitörleri

Sınıf D karbapenemazlar sıklıkla klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam, kloksasilin, boronik asit ya da çinko şelatörleri ile inhibe olmazlar. Sınıf D  $\beta$ -laktamazların in vitro ortamda 100 mM konsanstrasyonda sodyum klorür varlığında inhibe olabileceği bildirilmiştir (Poirel ve ark., 2010). Bu özelliğin diğer  $\beta$ -laktamaz sınıflarında bulunmaması, Sınıf D  $\beta$ -laktamazların in vitro tanımlamasında yararlı bir özelliktir (Poirel ve ark., 2004 ve Poirel ve ark., 2005). Fakat karbapenemaz taramasında bu özelliğe yönelik rutin fenotipik bir test geliştirilmemiştir. OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinde yüksek düzey temosilin direnci (MIK >32 mg/L) görülmesi fenotipik bir belirteç olarak kullanılabilir. Fakat bu durum sadece OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerine spesifik olmayıp başka direnç mekanizmalarından da kaynaklanabilir (Glupczynski ve ark., 2012 ve Hartl ve ark., 2013). Sınıf D karbapenemazlar içerisinde yer alan enzimlerin aminoasit dizilerindeki değişkenliğin fazla olması, bunların tanımlanmasında kullanılabilecek spesifik inhibitör testlerinin geliştirilmesini güçleştirmiştir. Dolayısıyla bunların laboratuvarında doğru tanımlanmasında, birçok araştırmacı moleküler yöntemlerin altın standart olarak kaldığını bildirmektedir (Miriagou ve ark., 2010; Nordmann ve ark., 2012b ve Poirel ve ark., 2010).

EUCAST, modifiye Hodge testini; hem elde edilen sonuçları değerlendirmedeki güçlükler hem de özgüllüğündeki düşüklük ve bazı durumlarda duyarlılığının da optimalin altında olması gibi nedenlerle önermemekte ve bunun yerine inhibitör tabanlı testlere yer verilmektedir. Kılavuzda sinerji varlığının ticari kitlerin önerileri doğrultusunda belirlenmesi istenilmekte ve fenotipik testin nasıl yorumlanacağına dair ana esaslar bildirilmektedir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015) (Çizelge 2.7).

**Çizelge 2. 7.** Difüzyon yöntemleriyle yapılan inhibitör tabanlı fenotipik testlerin yorumlanması (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015)

| <b>β-laktamaz</b>       | <b>10 µg meropenem disk/tabletine göre zon çapında artış şeklinde gözlenen sinerji varlığı</b> |                 |                 |            | <b>Temosilin<br/>MIK&gt;32 mg/L<br/>ya da zon<br/>çapı&lt;11 mm</b> |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------------|------------|---------------------------------------------------------------------|
|                         | <b>DPA/EDTA</b>                                                                                | <b>APBA/PBA</b> | <b>DPA+APBA</b> | <b>CLX</b> |                                                                     |
| <b>MBL</b>              | +                                                                                              | -               | -               | -          | <b>Değişken*</b>                                                    |
| <b>KPC</b>              | -                                                                                              | +               | -               | -          | <b>Değişken*</b>                                                    |
| <b>MBL+KPC**</b>        | <b>Değişken</b>                                                                                | <b>Değişken</b> | +               | -          | <b>Değişken*</b>                                                    |
| <b>OXA-48 benzeri</b>   | -                                                                                              | -               | -               | -          | <b>Evet</b>                                                         |
| <b>AmpC+porin kaybı</b> | -                                                                                              | +               | -               | +          | <b>Değişken*</b>                                                    |
| <b>GSBL+porin kaybı</b> | -                                                                                              | -               | -               | -          | <b>Hayır</b>                                                        |

MBL, metallo-β-laktamaz; KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz; DPA, dipikolinik asit; EDTA, etilen diamin tetraasetik asit; APBA, aminofenil boronik asit; PBA, fenil boronik asit; CLX, kloksasilin

\*Temosilin duyarlılık testi sadece inhibitörlerle sinerji saptanmadığı durumlarda, GSBL+porin kaybı ile OXA-48 benzeri enzimlerin varlığını birbirinden ayırt etmede önerilmektedir. Diğer karbapenemazların varlığında duyarlılık sonuçları değişkendir.

\*\*Çift inhibitör içeren (DPA/EDTA + APBA/PBA) ticari tabletlerin kullanımını destekleyen sadece bir yayın olup, çok-merkezli ya da çok sayıda tek-merkezli çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu kombinasyon yüksek düzey karbapenem direncini gösterir ki bu durum Yunanistan dışında nadirdir.

#### 2.4.3. Karbapenem içeren kromojenik besiyerleri

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin dünya genelinde yayılması, hızlı sürveyans yöntemlerinin kullanımını gündeme getirmiştir (Adler ve ark., 2011). Karbapenemaz üreticilerinin yayılımının önlenmesi, kolonize hastaların hastaneye yatışının erken dönemlerinde ya da yoğun bakım gibi spesifik bir üniteye geçişinden önce doğru şekilde saptanmasına bağlıdır. *Enterobacteriaceae* için rezervuar çoğunlukla intestinal flora olduğu için, sürveyans için en uygun örnekler

gaita ve rektal sürüntü olmaktadır. Taramalar en azından riskli hastaları (yoğun bakım hastaları, transplant alıcıları, immünsüprese hastalar, karbapenemaz üreticilerinin yaygın olduğu yabancı bir hastaneden transfer gibi) içerecek şekilde olmalıdır. Tarama amacıyla kullanılan besiyerleri karbapenemaz üreten organizmaları değil karbapenem dirençlileri tespit etmektedir (Nordmann ve Poirel, 2013).

Bu amaçla ilk piyasaya sürülen CHROMagar KPC besiyeridir ve içeriğinde bir karbapenem bulundurmaktadır (CHROMagar, Paris, Fransa). Bu besiyeri sadece yüksek düzey karbapenem direnci gösteren bakterileri saptamaktadır. Dolayısıyla ana dezavantajı; bazı metallo- $\beta$ -laktamaz ya da OXA-48 üreticilerinde olduğu gibi düşük düzey karbapenem direnci bulunan izolatları saptayamaması yani duyarlılığının düşük olmasıdır (Nordmann ve ark., 2011a).

Bir diğer tarama besiyeri de karbapenem içermektedir (CRE Brilliance, Thermo Scientific, ABD). KPC ve metallo- $\beta$ -laktamaz üreticilerini iyi saptamaktadır fakat tüm OXA-48 üreticilerini yakalayamamaktadır (Nordmann ve Poirel, 2013).

Farklı tiplerdeki tüm karbapenemaz üreticilerini yakayacak şekilde artırılmış duyarlılık ve özgüllüğe sahip ve içeriğinde kloksasilin, çinko ve bir karbapenem molekülü bulunan SUPERCARBA besiyeri ise yakın zamanda geliştirilmiştir (Girlich ve ark., 2013).

#### **2.4.4. Carba NP testi**

Carba NP testi; karbapenemlerin  $\beta$ -laktam halkasının test edilecek bakteri izolatu tarafından hidrolizi esaslı üzerine kurulmuş, hızlı, duyarlı, özgül ve herhangi bir laboratuvara adapte edilebilecek kullanışlı bir biyokimyasal test olarak ifade edilmektedir. Karbapenem hidrolizi sonucu pH değişimi olmaktadır ve böylece testte indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı solüsyonunun rengi kırmızıdan sarıya

dönmekte ve bu durum pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir (Nordmann ve ark., 2012c).

Carba NP testinin karbapenemaz tiplerini birbirinden ayırt edememesi hususundaki sınırlamasını aşmak için aynı araştırmacılar tarafından Carba NP2 ismi verilen yeni bir test daha geliştirilmiştir. Bu test de benzer mantıkla karbapenemlerin  $\beta$ -laktam halkasının test edilecek bakteri izolatu tarafından hidrolizi esaslı üzerine kurulmuştur. *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas spp.*'de hem karbapenemaz tayini hem de tiplendirmesi için geliştirilmiştir. CarbaNP testinden farklı olarak her bir izolat, içinde bir karbapenem molekülüne ilaveten Sınıf A ve Sınıf B karbapenemaz inhibitörleri bulunan kuyucuklara inoküle edilmekte ve renk değişimi olup olmamasına göre karbapenemaz varlığı ve tip tayini yapılmaktadır (Dortet ve ark., 2012).

EUCAST kılavuzunda Carba NP testinin Mueller-Hinton agar, kanlı agar, triptikaz soy agar ve karbapenemaz üreticilerinin taranmasında kullanılan çoğu seçici besiyerinde üreyen bakteriyel koloniler için valide edildiği bildirilmiştir. Tekrarlanabilir sonuçlar elde edebilmek için yöntemin farklı basamaklarının dikkatli şekilde takip edilmesi gerektiği ifade edilmiştir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015).

#### **2.4.5. Moleküler yöntemler**

Moleküler yöntemler, karbapenemazların belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesinde referans yöntem olmaya devam etmektedir. Çoğunluğu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) tabanlı olan bu yöntemleri, eğer sadece karbapenemaz grubunu belirlemek (örn. VIM-tipi, KPC-tipi, NDM tipi ya da OXA-tipi gibi) yeterli görülmezse dizi analizi takip edebilir ve böylelikle karbapenemaz geninin hangi varyantı olduğu da (VIM-1, KPC-2, NDM-1 gibi) belirlenebilir.

Tekli PZR teknikleri uygulanabileceği gibi multipleks ya da gerçek zamanlı PZR uygulamaları da yapılabilmektedir. Yayınlanan primerler ve standardize döngü koşulları ile klinik olarak yaygın karbapenemaz genleri kolay şekilde saptanabilmektedir.

Koloniler üzerinden PZR yöntemi ile çalışıldığında, mükemmel duyarlılık ve özgüllük, 4-6 saat içinde sonuç elde edilebilmektedir. Gerçek zamanlı PZR teknolojisi kullanıldığında ise daha kısa bir sürede sonuç elde edilebilmektedir (Nordmann ve Poirel, 2013).

Bunların haricinde ticari olarak satılan PZR kitleri de mevcuttur. Bunlardan Check-MDR CT102 DNA microarray gibi bazıları DNA amplifikasyonunu takiben tüp mikroarray içinde amplikon saptanması esasına dayanmaktadır. Dolayısıyla tek bir test tüpünde birçok gen saptanabilmektedir (Hammoudi ve ark., 2014). Stuart ve arkadaşlarının (2012) bir çalışmasında, bu sistemle KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve VIM+KPC üreten ve meropenem MİK değerleri 0,5 mg/L'ye eşit veya daha yüksek enterobakteriyel izolatların % 100 özgüllük ve % 97 duyarlılıkla saptandığı bildirilmiştir.

Bir diğer tipteki ticari amplifikasyon kitinde ise karbapenemaz gen amplifikasyonunu ELISA takip etmektedir (Gazin ve ark., 2012). Hyplex-MBL ID Multiplex PCR-ELISA ticari kitinde, DNA multipleks PZR aracılığıyla çoğaltıldıktan sonra polistren kaplı ELISA plaklarına sabitlenir. Ardından spesifik oligonükleotid problemleri ile hibridize edilir ve oluşan kompleksler peroksidaz işaretli konjuge antikorlar aracılığıyla renk değişimi şeklinde saptanır (Hammoudi ve ark., 2014). Yunanistan'da yapılan bir çalışmada, bu metodla VIM üreten *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Enterobacteriaceae* izolatları % 98 duyarlılık ve % 98,6 özgüllükle saptanmıştır (Avlami ve ark., 2010). Hyplex-MBL ID Multiplex PCR-ELISA metodu ile sonuç almak için 4,5-6 saat gibi bir süre gerekmektedir (Ambretti ve ark., 2013).

Moleküler tabanlı tekniklerin ana dezavantajları maliyetlerinin daha yüksek oluşu, eğitilmiş teknisyene ihtiyaç duyulması ve tanımlanmamış nadir genleri saptayamaması olarak sıralanabilir. Genlerin sekanslanması çoğunlukla araştırma ya

da epidemiyolojik amaçlarla yapılabilir. Karbapenemaz tipinin kesin olarak tanımlanmasına ne hasta tedavisi açısından ne de salgınları önlemek açısından ihtiyaç bulunmamaktadır (Nordmann ve Poirel, 2013). Karbapenemaz kodlayan genlerdeki yüksek çeşitlilik ve artan sayıdaki yeni varyantlar nedeniyle karbapenem dirençli bir suşta elde edilen negatif PZR sonucu, bir referans laboratuvarında ilave genotipik analizlerle yeniden değerlendirilmelidir (Stuart ve ark., 2010).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi ve Tiplendirimi

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ertapeneme orta duyarlılık ya da direnç gösteren *Enterobacteriaceae* ailesindeki enterik gram negatif bakteriler çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen klinik örnekler 2010-2014 yılları arasında toplanılmış olup çoğunluğunu yoğun bakım ünitelerinden gelen örnekler oluşturmaktadır. Gelen örnekler başta idrar, abse ve kan örnekleri olmak üzere trakeal aspirat/bronş lavajı, yara, dren, doku ve steril vücut sıvı örneklerinden oluşmaktadır.

Üreyen mikroorganizmaların tür tayinleri, Phoenix (Becton Dickinson, ABD) otomatize tiplendirim sistemiyle yapılmıştır.

#### 3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilen suşlar ve kontrol suşları için antibiyotik duyarlılık testleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Ertapenem ve meropenem için MİK değerlerini belirlemek için gradiyent difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Sonuçlar CLSI (2015) ve EUCAST (2015) kriterlerine göre yorumlanmıştır.

### **3.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi**

#### **3.2.1.1. Gereçler**

##### **3.2.1.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması**

EMB besiyeri,

Mueller Hinton Agar besiyeri

##### **EMB Agar Hazırlanması**

Dehidrate besiyeri (Merck, Almanya), 36 g tartılmış ve 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

##### **Mueller Hinton Agar Hazırlanması**

Mueller Hinton agar (MHA) dehidrate besiyeri (Merck, Almanya) 34 g tartılmış ve 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra 150 mm çaplı petri plaklarına dökülmüştür.

##### **3.2.1.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg) (Oxoid, İngiltere),

Piperasilin-tazobaktam (100/10 µg) (Oxoid, İngiltere),

Sefazolin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),

Sefepim (30 µg) (Oxoid, İngiltere),

Sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere),

Sefotaksim (30 µg) (Bioanalyze, Türkiye),

Sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) (Bioanalyze, Türkiye),

Seftazidim (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Seftazidim (30 µg) (Bioanalyze, Türkiye),  
Seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) (Bioanalyze, Türkiye),  
Sefoksitin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Aztreonam (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Doripenem (10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Ertapenem (10 µg)(Oxoid, İngiltere),  
İmipenem (10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Meropenem (10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Amikasin (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Gentamisin (10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Siprofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Levofloksasin (5 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg) (Oxoid, İngiltere).

#### **3.2.1.1.3. Araçlar**

Etüv (Heraus, Almanya)  
Otoklav (Nüve, Türkiye)  
Phoenix Spec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD)

#### **3.2.1.2. Yöntem**

Toplanan suşlar, PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD) nefelometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland standardına uygun şekilde, fizyolojik tuzlu içinde süspanse edilmiştir. Hazırlanan süspansiyondan MHA besiyerine eküvyonla yoğun ekim yapılmıştır. Besiyeri plağı 3-5 dakika kuruduktan sonra 150 mm'lik her bir petri plağında en fazla 12 disk olacak şekilde, amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), sefazolin (30 µg), sefepim (30

µg), sefotaksim (30 µg), sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg), seftazidim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg), sefoksitin (30 µg), aztreonam (30 µg), doripenem (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg) ve trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Hazırlanan plaklar 35–37°C’de 18–24 saat süre ile inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları CLSI (2015) önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir. İnhibisyon zon çapları Çizelge 3.1’de verilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** Kirby-Bauer Disk Difüzyon yönteminde kullanılan antibiyotiklerin *Enterobacteriaceae* için duyarlılık zon çapları (CLSI, 2015)

| <b>Antibiyotik</b>          | <b>S</b> | <b>I</b>       | <b>R</b> | <b>Antibiyotik</b>          | <b>S</b> | <b>I</b> | <b>R</b> |
|-----------------------------|----------|----------------|----------|-----------------------------|----------|----------|----------|
| Amoksisilin-klavulanik asit | ≥18      | 14-17          | ≤13      | İmipenem                    | ≥23      | 20-22    | ≤19      |
| Piperasilin-tazobaktam      | ≥21      | 18-20          | ≤17      | Meropenem                   | ≥23      | 20-22    | ≤19      |
| Sefazolin                   | ≥23      | 20-22          | ≤19      | Doripenem                   | ≥23      | 20-22    | ≤19      |
| Sefepim                     | ≥25      | 19-24<br>(SDD) | ≤18      | Amikasin                    | ≥17      | 15-16    | ≤14      |
| Seftazidim                  | ≥21      | 18-20          | ≤17      | Gentamisin                  | ≥15      | 13-14    | ≤12      |
| Sefotaksim                  | ≥26      | 23-25          | ≤22      | Siprofloksasin              | ≥21      | 16-20    | ≤15      |
| Sefoksitin                  | ≥18      | 15-17          | ≤14      | Levofloksasin               | ≥17      | 14-16    | ≤13      |
| Aztreonam                   | ≥21      | 18-20          | ≤17      | Trimetoprim-sülfametoksazol | ≥16      | 11-15    | ≤10      |
| Ertapenem                   | ≥22      | 19-21          | ≤18      |                             |          |          |          |

### **3.2.2. GSBL aranması**

#### **3.3.2.1. Gereç**

##### **3.3.2.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması**

##### **Mueller Hinton Agar ve Hazırlanması**

Mueller Hinton agar dehidrate besiyeri (Merck, Almanya) 34 g tartılmış ve distile su ile 1000 ml olacak şekilde tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra 150 mm çaplı petri plaklarına dökülmüştür.

##### **3.3.2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Sefotaksim (30 µg) (Bioanalyze, Türkiye),  
Sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) (Bioanalyze, Türkiye)  
Seftazidim (30 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Seftazidim (30 µg) (Bioanalyze, Türkiye),  
Seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) (Bioanalyze, Türkiye),

##### **3.3.2.1.3. Araçlar**

Etüv (Heraus, Almanya)  
Otoklav (Nüve, Türkiye)  
Phoenix Spec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD)

### **3.3.2.2. Yöntem**

#### **3.3.2.2.1. Çift Disk Sinerji Testi ile GSBL Doğrulaması**

PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD) nefelometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan yoğun ekim yapılan MHA üzerine çift disk sinerji testi için EUCAST önerileri (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015) doğrultusunda amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg) (Oxoid, İngiltere) ve sefotaksim (30 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri, merkezden merkeze mesafeleri 20 mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C’de 18–24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sefotaksim diski etrafındaki inhibisyon zonunda amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru bir genişleme varlığı pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir.

#### **3.3.2.2.1. Kombine Disk Difüzyon Testi ile GSBL Doğrulaması**

PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD) nefelometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan yoğun ekim yapılan MHA üzerine CLSI (2015) ve EUCAST önerileri (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015) doğrultusunda sefotaksim (30 µg), sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg), seftazidim (30 µg) ve seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Kombine disklerin temin edildiği firmanın (Bioanalyze, Türkiye) ürettiği sefotaksim (30 µg) ve seftazidim (30 µg) diskleri de MHA üzerine yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C’de 18–24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda sefotaksim ve seftazidim diskleri ile bunların klavulanik asitli kombinasyonlarının etrafında oluşan zon çapları ölçülmüştür. Sefotaksim ve sefotaksim/klavulanik asit diskleri etrafındaki zon çapları arasındaki fark  $\geq 5\text{mm}$  ve aynı şekilde seftazidim ve

seftazidim/klavulanik asit diskleri etrafındaki zon çapları arasındaki fark  $\geq 5\text{mm}$  ise sonuç pozitif olarak değerlendirilmiştir.

### **3.2.3. Gradiyent difüzyon test yöntemi**

#### **3.2.3.1. Gereç**

##### **3.2.3.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması**

###### **Mueller Hinton Agar ve Hazırlanması**

Mueller Hinton agar dehidrate besiyeri (Merck, Almanya) 34 g tartılmış ve distile su ile 1000 ml olacak şekilde tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra 150 mm çaplı petri plaklarına dökülmüştür.

##### **3.3.2.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Ertapenem G-test şeriti (Liofilchem, İtalya),  
Meropenem G-test şeriti (Liofilchem, İtalya).

##### **3.3.2.1.3. Araçlar**

Etüv (Heraus, Almanya)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Phoenix Spec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD)

### 3.3.2.2. Yöntem

PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD) nefelometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan MHA üzerine yoğun ekim yapılmıştır. Besiyerinin 3-5 dakika kuruması beklendikten sonra biri ertapenem, diğeri meropenem olmak üzere iki adet G-test stripi yerleştirilmiştir. Plaklar 35°C’de 18–24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklar aydınlık bir ortamda koyu renk bir zeminin üzerinde, göz ile değerlendirilerek tam inhibisyon zonunun gradiyent test şeridine temas ettiği konsantrasyon belirlenmiştir. İnhibisyon zonunun iki değer arasında kalması halinde yüksek olan değer MİK olarak kabul edilmiştir. İnhibisyon zonunun şeride temas ettiği yer belirgin değilse ya da çift zon oluşmuşsa sonuçlar geçersiz sayılıp test tekrar edilmiştir. Elde edilen MİK değerleri CLSI (2015) ve EUCAST (2015) kılavuzlarına göre ayrı ayrı değerlendirilmiştir (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3. 2.** EUCAST (2015) ve CLSI (2015) kılavuzlarına göre *Enterobacteriaceae* için ertapenem ve meropenem MİK değerleri

| Karbapenem | EUCAST MİK<br>değeri mg/L |     | CLSI MİK değeri<br>µg/mL |     |
|------------|---------------------------|-----|--------------------------|-----|
|            | S ≤                       | R > | S ≤                      | R ≥ |
| Ertapenem  | 0.5                       | 1   | 0,5                      | 2   |
| Meropenem  | 2                         | 8   | 1                        | 4   |

MİK, minimum inhibitör konsantrasyon; S, duyarlı; R, dirençli

### 3.3. Modifiye Hodge testi

#### 3.3.1. Gereç

##### 3.3.1.1. Besiyerleri ve Besiyerlerinin Hazırlanması

### **Mueller Hinton Agar ve Hazırlanması**

Mueller Hinton agar dehidrate besiyeri (Merck, Almanya) 34 g tartılmış ve distile su ile 1000 ml olacak şekilde tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiş, soğuduktan sonra 150 mm çaplı petri plaklarına dökülmüştür.

#### **3.3.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Ertapenem (10 µg) (Oxoid, İngiltere),  
Meropenem (10 µg) (Oxoid, İngiltere).

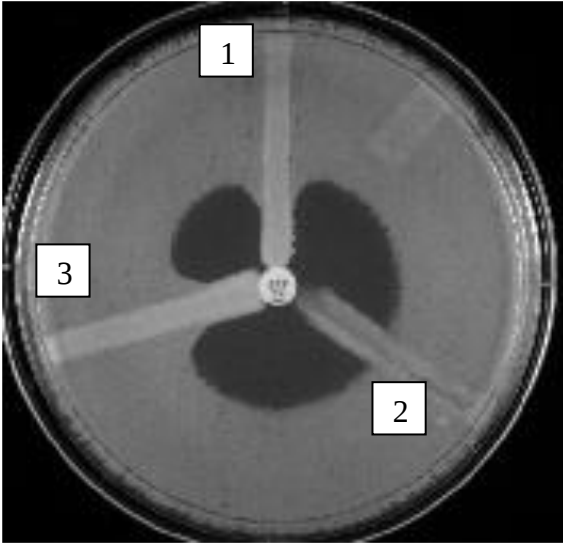
#### **3.3.1.3. Araçlar**

Etüv (Heraus, Almanya)  
Otoklav (Nüve, Türkiye)  
Phoenix Spec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD)

#### **3.3.2. Yöntem**

PhoenixSpec Nephelometer (Becton Dickinson, ABD) nefelometre cihazı kullanılarak *E.coli* ATCC 25922 suşundan 0,5 McFarland bulanıklığında iki adet bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonlarından biri CLSI (2015) önerileri doğrultusunda, steril fizyolojik tuzlu su ile 1:10 oranında sulandırılmıştır. Diğeri ise bakteri inokülüm yoğunluğunun test üzerindeki etkisini karşılaştırmak üzere sulandırılmadan kullanılmıştır. 1:10 oranında sulandırılmış ve sulandırılmamış bakteri süspansiyonlarından pamuklu çubuk yardımıyla iki ayrı MHA üzerine yoğun ekim yapılmıştır. Besiyerilerinin 3-5 dakika kuruması beklendikten sonra 150

mm'lik petri plağında 1-4 adet olacak şekilde ertapenem (10 µg) ya da meropenem (10 µg) diskleri yerleştirilmiştir. Daha sonra 10 µL'lik öze yardımıyla test edilecek suşlardan ya da kontrol suşlarından 3-5 koloni alınarak karbapenem diskinin kenarından başlayarak en az 20-25 mm uzunlukta düz bir hat boyunca bakteri ekimi yapılmıştır. Pozitif kontrol olarak PZR ile OXA-48 üreticisi olarak saptanan suşlardan biri, negatif kontrol olarak da PZR çalışmamızda 11 gen açısından negatif bulunan ve modifiye Hodge testinde negatif sonuç elde edilen bir suş kullanılmıştır. 35°C'de 16–20 saatlik inkübasyonun ardından plaklar değerlendirilmiştir. Karbapenem diskinin etrafında oluşan inhibisyon zonunun, test edilen izolatın ekim çizgisine doğru girinti yapması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Aksi durum ise negatif sonuç olarak yorumlanmıştır. Test edilen izolatın ekildiği hattın etrafında üreme olmaması ise belirsiz sonuç olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).



**Şekil 3. 1.** 100 mm'lik Mueller Hinton agar plağında gerçekleştirilen modifiye Hodge testi (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, pozitif sonuç (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, negatif sonuç ve (3) Pozitif sonuç veren bir klinik izolat (CLSI, 2015)

### **3.4. Multipleks PZR için Bakterilerden DNA Eldesi**

#### **3.4.1. Gereç**

##### **3.4.1.1. Besiyerleri**

##### **EMB Agar Hazırlanması**

Dehydrate besiyeri (Merck, Almanya), 36 g tartılmış ve 1000 ml distile su ile tamamlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Soğuduktan sonra petri plaklarına dökülmüştür.

##### **3.4.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Proteinaz K (20 mg/ml) (Thermo Scientific, ABD)

GeneJET Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific, ABD)

##### **3.4.1.3. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **Proteinaz K tamponu (pH 8.0)**

250 mM EDTA (Applichem, Almanya)

% 1 Sarkosyl (Applichem, Almanya)

1000 ml ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanır

##### **3.4.1.4. Araçlar**

Çok kanallı pipet (Thermo Scientific, ABD)

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo Scientific, ABD)  
Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)  
Manyetik karıştırıcı (WTWInolab, ABD)  
Hassas Terazî (WTWInolab, ABD)  
Etüv (Heraeus, Almanya)  
Öze (1µl'lik)

### **3.4.2. Yöntem**

PZR'de kullanılacak bakteri DNA'sının elde edilmesi için; her bir suşun EMB agara ekimi yapıлып besiyerinde bir gecelik kültürünü takiben bir öze (1µl'lik) dolusu koloni, 400 µl proteinaz K tamponu içerisine toplanmıştır. Solüsyona 20 mg/mL'lik proteinaz K enziminden 4-5 µL eklenerek 37°C'de 4 saat bekletildikten sonra ekstraksiyon işlemine GeneJET Genomic DNA purification kit (Thermo Scientific, ABD) ile üretici firmanın önerileri doğrultusunda devam edilmiştir. Kit talimatındaki süre ve miktarlara uygun şekilde bakteri süspansiyonu santrifüj edilip dibindeki pellete sırasıyla digestion solüsyonu, proteinaz K, RNase A, lysis solüsyonu, etanol, yıkama tamponu I, yıkama tamponu II, elution tamponu eklenerek ve kit prosedüründe geçtiği şekliyle kolonlara aktarılıp santrifüj işlemleri tekrar edilerek, işlem sonunda mikrosantrifüj tüplerinde bakteri DNA'ları elde edilmiştir.

## **3.5. Multipleks PZR Yöntemi ile Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması**

### **3.5.1. Gereç**

#### **3.5.1.1. Sarf Malzemeleri**

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)  
Steril PZR tüpü 0,2 ml (Orange Scientific, Belçika)  
Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo Scientific, ABD)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)  
Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

#### **3.5.1.2. Kimyasal Madde ve Malzemeler**

Maxima Hot Start Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific, ABD)  
10x Maxima Hot Start *Taq* buffer (Thermo Scientific, ABD)  
25 mM MgCl<sub>2</sub> (Thermo Scientific, ABD)  
dNTP Karışımı (10mM) (Thermo Scientific, ABD)  
Karbapenemaz primerleri (Ellabiotech, Almanya)  
Moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)  
Etidyum bromid (Applichem, Almanya)  
6x Loading dye solüsyon – yükleme solüsyonu (Thermo Scientific, ABD)  
GeneRuler 50bp DNA Ladder, 50-1000bp (Thermo Scientific, ABD)

#### **3.5.1.3. Kullanılan Solüsyonlar**

##### **5x TBE (pH 7-9):**

54 g Tris (Trizma base, Sigma, ABD)  
27,5 g Borik asit (Applichem, Almanya)  
20 ml 0,5 M EDTA (Applichem, Almanya) (pH :8)

##### **0.5x TBE (pH 7-9):**

5x TBE 1/10 oranında ddH<sub>2</sub>O ile sulandırılmasıyla hazırlanmıştır

#### **3.5.1.4. Araçlar**

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Vorteks (HVD, Avusturya)

Termal döngü cihazı (Techne, İngiltere)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Elektroforez tankı (Thermo Scientific, ABD)

Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad, ABD)

UV transillüminatör (Vilber -LourmatTFX–20.M [ETX–20 M], Fransa)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

### **3.5.2. Yöntem**

#### **3.5.2.1. PZR yöntemi**

Çalışmamızda multipleks PZR yöntemiyle 11 adet karbapenemaz geni araştırılmış olup bunlardan bir kısmı (blaIMP, blaVIM, blaSPM, blaKPC, blaNDM ve blaOXA-48) klinik izolatlarda sıklıkla identifiye edilen genlerden olup, bir kısmı da minor karbapenemaz genlerini (blaGIM, blaSIM, blaAIM, blaDIM ve blaBIC) içermektedir. Araştırılacak genler ve bu amaçla kullanılacak primerler Poirel ve arkadaşlarının (2011a) yaptığı çalışmaya uygun şekilde seçilmiştir. Kullanılacak primerlerin listesi Çizelge 3.3'te yer almaktadır.

**Çizelge 3. 3.** Karbapenemaz genlerinin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri

| Primer | Sekans(5'-3')          | Gen       | PZR ürününün büyüklüğü(bp) |
|--------|------------------------|-----------|----------------------------|
| IMP-F  | GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC | blaIMP    | 232                        |
| IMP-R  | GGTTTAAYAAAACAACCACC   |           |                            |
| SPM-F  | AAAATCTGGGTACGCAAACG   | blaSPM    | 271                        |
| SPM-R  | ACATTATCCGCTGGAACAGG   |           |                            |
| AIM-F  | CTGAAGGTGTAGGGAAACAC   | blaAIM    | 322                        |
| AIM-R  | GTTCGGCCACCTCGAATTG    |           |                            |
| VIM-F  | GATGGTGTTTGGTCGCATA    | blaVIM    | 390                        |
| VIM-R  | CGAATGCGCAGCACCAG      |           |                            |
| OXA-F  | GCGTGGTTAAGGATGAACAC   | blaOXA-48 | 438                        |
| OXA-R  | CATCAAGTTCAACCCAACCG   |           |                            |
| GIM-F  | TCGACACACCTTGGTCTGAA   | blaGIM    | 477                        |
| GIM-R  | AACTTCCAACCTTGCCATGC   |           |                            |
| BIC-F  | TATGCAGCTCCTTTAAGGGC   | blaBIC    | 537                        |
| BIC-R  | TCATTGGCGGTGCCGTACAC   |           |                            |
| SIM-F  | TACAAGGGATTCGGCATCG    | blaSIM    | 570                        |
| SIM-R  | TAATGGCCTGTTCCCATGTG   |           |                            |
| NDM-F  | GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC  | blaNDM    | 621                        |
| NDM-R  | CGGAATGGCTCATCACGATC   |           |                            |
| DIM-F  | GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG  | blaDIM    | 699                        |
| DIM-R  | CGTTCGGCTGGATTGATTTG   |           |                            |
| KPC-Fm | CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG   | blaKPC    | 798                        |
| KPC-Rm | CTTGTCATCCTTGTTAGGCG   |           | 232                        |

(F: Forward primer, R: Reverse primer, Y= C ya da T)

PZR karışımı ve döngü koşulları da Poirel ve arkadaşlarının (2011a) çalışmalarındaki yöntemler modifiye edilerek uygulanmıştır. Multipleks PZR reaksiyonu, üç ayrı PZR tüpünde gerçekleştirilmiştir. Birinci reaksiyon tüpünde OXA-48, BIC, NDM ve KPC genleri; ikinci reaksiyon tüpünde IMP, SPM ve VIM genleri; üçüncü reaksiyon tüpünde ise AIM, GIM, SIM ve DIM genleri olmak üzere

toplam 11 genin varlığı araştırılmıştır. Her bir tüp için reaksiyon karışımları ve döngü koşulları aşağıda verilmiştir.

### **1.Reaksiyon Tüpündeki PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı** N

|                                    |       |           |
|------------------------------------|-------|-----------|
| dH <sub>2</sub> O                  | ..... | ×N        |
| 10x Maxima Hot Start Taq tamponu   | ..... | 5 µl×N    |
| dNTP                               | ..... | 0,2 mM×N  |
| MgCl <sub>2</sub>                  | ..... | 2 mM×N    |
| OXA-48 F primer                    | ..... | 10 pmol×N |
| OXA-48 R primer                    | ..... | 10 pmol×N |
| NDM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| NDM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| KPC F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| KPC R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| BIC F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| BIC R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| Maxima Hot Start Taq DNA polimeraz | ..... | 2 U×N     |
| DNA                                | ..... | 2 µL×N    |
| Total volüm                        | ..... | 50 µl×N   |

### **1.Reaksiyon Tüpü için PZR Programı**

|                              |       |                    |
|------------------------------|-------|--------------------|
| Başlangıç denatürasyonu      | ..... | 94 °C’de 10 dakika |
| Denatürasyon aşaması         | ..... | 94 °C’de 30 saniye |
| Primer yapışması (annealing) | ..... | 52°C’de 40 saniye  |
| Sentez (uzama) aşaması       | ..... | 72 °C’de 50 saniye |
| Son uzama                    | ..... | 72 °C’de 5 dakika  |

## **2.Reaksiyon Tüpündeki PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı N**

|                                    |       |           |
|------------------------------------|-------|-----------|
| dH <sub>2</sub> O                  | ..... | ×N        |
| 10x Maxima Hot Start Taq tamponu   | ..... | 5 µl×N    |
| dNTP                               | ..... | 0,2 mM×N  |
| MgCl <sub>2</sub>                  | ..... | 1,5 mM×N  |
| VIM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| VIM Rprimer                        | ..... | 10 pmol×N |
| IMP F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| IMP R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| SPM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| SPM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| Maxima Hot Start Taq DNA polimeraz | ..... | 2 U×N     |
| DNA                                | ..... | 2 µL×N    |
| Total volüm                        |       | 50 µl×N   |

## **2. Reaksiyon Tüpü için PZR Programı**

|                              |       |                    |
|------------------------------|-------|--------------------|
| Başlangıç denatürasyonu      | ..... | 94 °C’de 10dakika  |
| Denatürasyon aşaması         | ..... | 94 °C’de 30 saniye |
| Primer yapışması (annealing) | ..... | 56 °C’de 40 saniye |
| Sentez (uzama) aşaması       | ..... | 72 °C’de 50 saniye |
| Son uzama                    | ..... | 72 °C’de 5 dakika  |

### **3.Reaksiyon Tüpündeki PZR Protokolü için Reaksiyon Karışımı N**

|                                    |       |           |
|------------------------------------|-------|-----------|
| dH <sub>2</sub> O                  | ..... | ×N        |
| 10x Maxima Hot Start Taq tamponu   | ..... | 5 µl×N    |
| dNTP                               | ..... | 0,2 mM×N  |
| MgCl <sub>2</sub>                  | ..... | 1,5 mM×N  |
| DMSO                               | ..... | 3 µl ×N   |
| AIM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| AIM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| GIM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| GIM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| SIM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| SIM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| DIM F primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| DIM R primer                       | ..... | 10 pmol×N |
| Maxima Hot Start Taq DNA polimeraz | ..... | 2 U×N     |
| DNA                                | ..... | 2 µL×N    |
| Total volüm                        |       | 50 µl×N   |

### **3.Reaksiyon Tüpü için PZR Programı**

|                              |       |                    |
|------------------------------|-------|--------------------|
| Başlangıç denatürasyonu      | ..... | 94 °C’de 10 dakika |
| Denatürasyon aşaması         | ..... | 94 °C’de 30 saniye |
| Primer yapışması (annealing) | ..... | 52 °C’de 40 saniye |
| Sentez (uzama) aşaması       | ..... | 72 °C’de 50 saniye |
| Son uzama                    | ..... | 72 °C’de 5 dakika  |

#### **3.5.2.2. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürününün Agaroz Jel Elektrofrezinde Saptanması**

Karbapenemaz genleri için PZR ürünleri % 2’lik agaroz jelde değerlendirilmiştir. Agaroz jel için 1,6 g moleküler grade agaroz (Vivantis, Malezya)

0,5 x TBE ile 80 ml'ye tamamlanmıştır. TBE 0,5 x solüsyonu; TBE 5 x solüsyonunun 1/10 oranında ultra saf su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE içerisine alınan agaroz mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmıştır. Soğuduktan sonra üzerine etidyum bromidin (Applichem, Almanya) % 5'lik stok solüsyonundan 3 µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış ve uygun taraklar konulmuş jel tabağına (Thermo Scientific, ABD) dökülmüştür. Agarozun donması için yaklaşık 45 dk bekleme süresinden sonra, jel tabağıyla birlikte elektroforez tankına (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiştir. Elektroforez tankı 0,5 x TBE solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulmuştur. PZR ürünlerinden 6 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3 µl yükleme solüsyonu (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılmış ve jel üzerinde tarağın çıkarılmasıyla açılan kuyucuklara yüklenmiştir. 1 saat 100 V elektrik akımına tabi tutulup, elektroforez işlemi uygulandıktan sonra, 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber -LourmatTFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile değerlendirilmiştir. Elde edilen bantlar fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile görüntülenmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde belirteç olarak GeneRuler DNA Ladder 50bç, ready-to-use, 50-1000 bç, (Thermo Scientific, ABD) kullanılmıştır.

### **3.6. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)**

Çalışmamıza dahil ettiğimiz *Enterobacteriaceae* ailesi bakterileri cins ve türlerine göre ayrılarak, her tür için ayrı olmak üzere bakteriler arasındaki klonal ilişki PFGE yöntemi ile araştırılmıştır.

### 3.6.1. Gereç

#### 3.6.1.1. Sarf Malzemeleri ve Kimyasal Malzemeler

Ayarlı, hacimli otomatik pipetler (Thermo Scientific, ABD)

Beyin kalp infüzyon buyyonu (Merck, Almanya)

EMB agar (Merck, Almanya)

Etidyum bromid (Applichem, Almanya)

Gel Compar II (Applied Biosystems, Belçika)

Lambda PFGE marker (New England Biolabs, İngiltere)

Lateks muayene eldiveni (Dolphin, Türkiye)

Lizozim (Applichem, Almanya)

Öze (Isolab, Almanya)

Petri kutusu küçük 90 x17 mm (Isolab Almanya)

Proteinaz K (20 mg/ml) (Thermo Scientific, ABD)

*Xba*I (Thermo Scientific, ABD)

Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri (Orange Scientific, Belçika)

Steril 15 ml'lik falkon tüp (Isolab, Almanya)

Steril filtreli pipet uçları 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl (Ratiolab, Almanya)

10X buffer tango (Thermo Scientific, ABD)

#### 3.6.1.2. Kullanılacak Solüsyonlar

##### **EDTA Tamponu (pH=8):**

10 mM EDTA (Applichem, Almanya)

ddH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanır

##### **Hücre Lizis Tamponu**

100 mM Tris (Trizma base, Sigma, ABD)

100 mM EDTA (Applichem, Almanya)

% 0,5 Sodyum lauroylsarcosine (Applichem, Almanya)

ddH<sub>2</sub>O ile 1000 ml'ye tamamlanır

**TE Tamponu (pH=8):**

10 mM Tris (Trizma base, Sigma, ABD)

1 mM EDTA (Applichem, Almanya)

**5x TBE (pH 7-9):**

54 g Tris (Trizma base, Sigma, ABD)

27,5 g Borik asit (Applichem, Almanya)

20 ml 0,5 M EDTA (Applichem, Almanya) (pH :8)

**0.5x TBE (pH 7-9):**

5x TBE 1/10 oranında ddH<sub>2</sub>O ile sulandırılmasıyla hazırlanmıştır

**% 1 düşük erime sıcaklığına sahip agaroz hazırlanması**

0,1 mg 'low melt point' agaroz (Bio Basic, Kanada)

10 ml TE

Mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) eritilmiştir

**% 1'lik pulsed-field elektroforez agaroz jelinin hazırlanması**

1 gr 'pulsed field' agaroz (Bio-Rad, ABD)

100 ml 0,5x TBE

Mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) eritilmiştir

**3.6.1.3. Araçlar**

Vorteks (HVD, Avusturya)

Santrifüj (Eppendorf, Almanya)

Etüv (Heraeus, Almanya)

Otoklav (Nüve, Türkiye)

Nanofotometre (Implen, Almanya)

Derin dondurucu (Regal, Türkiye)

UV transillüminatör (Vilber -LourmatTFX–20.M (ETX–20 M), Fransa)

Kuru ısıtıcı blok (HVD, Avusturya)

Çalkalayıcı (HVD, Avusturya)

Çalkalayıcılı su banyosu (GFL, Almanya)

Mikrodalga fırın (Vestel, Türkiye)

Hassas terazi (Mettler- Toledo, İsviçre)

Fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada)

CHEF-DR II sistemi (Bio-Rad, ABD)

Gel Compar II (Applied Biosystems, Belçika)

### **3.6.2. Yöntem**

#### **3.6.2.1. PFGE Yönteminde Kullanılacak İzolatların Hazırlanması**

1. Otomatize sistemler ile tür düzeyinde tanımlanan ve -20 °C’de % 4’lük gliserollü buyyonda saklanan bakteri izolatları, EMB agara ekilip 37 °C’de 20-24 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir.
2. Üreyen kolonilerden birer öze dolusu (1 µl’lik özeler ile) alınıp 2,5 ml beyin kalp infüzyon buyyonu içerisinde ve 14-18 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır.
3. 18 saati geçmeyecek şekilde inkübe edilen beyin kalp infüzyon buyyonları etüvden çıkarıldıktan sonra 1,5 mL’lik ependorflara 400’er µl olacak şekilde dağıtılmıştır. Ependorflar 3000 rpm’de 5 dakika santrifügasyon (Eppendorf, Almanya) işlemine tabi tutulmuştur.
4. Santrifügasyon sonrası üstteki kısım dökülerek dipteki pellet bırakılmıştır. Pellet üzerine daha önce hazırlanıp 0°C’de bekletilen 10 mM EDTA solüsyonundan 600 µl ilave edilmiştir. Dipteki pelletin homojen şekilde dağılması için nazikçe pipetaj yapılmıştır. Sonrasında bakteri-EDTA süspansiyonundan 200 µl alınarak

nanofotometrede (Implen, Almanya) optik dansite ölçümü yapılmıştır. Optik dansitesi 0,8-1,0 arasında bulunanların ependorfta kalan 400 µl'lik süspansiyonları ile protokolün sonraki adımına devam edilmiştir. Optik dansitesi istenilen aralıkta bulunmayan örnekler için 10 mM EDTA ile sulandırım yapıldıktan sonra son hacim yine 400 µl'ye ayarlanmıştır.

5. 400 µl'lik bakteri-EDTA süspansiyonu ısıtıcı blokta (HVD, Avusturya) 75°C'de 10 dakika bekletilmiştir.
6. Isıtıcı bloktan alınan örnekler +4 °C'de 10-15 dakika bekletilmiştir.
7. Her bir örneğin üzerine 20 µl proteinaz K (Thermo Scientific, ABD) ve 10 µl lizozim (Applichem, Almanya) eklenmiştir.

#### **3.6.2.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi**

1. % 1'lik düşük erime sıcaklığına sahip agaroz (Bio Basic, Kanada) mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) birkaç defa kaynamasına izin verilerek iyice eritilip, 55°C'lik su banyosuna yerleştirilmiştir. Bu arada agaroz kalıbı hazırlanmıştır.
2. Yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu üzerine eşit miktarda % 1'lik LMP agarozdan (430 µl) pipetaj yaparak (baloncuk oluşmamasına özen gösterilerek) karıştırılmıştır.
3. Bu karışımdan pipet yardımıyla 100 µl alınıp agoroz kalıbının kuyucuklarına hava kabarcığı olmamasına özen göstererek dağıtılmıştır.
4. Kalıplar oda sıcaklığında 15-20 dakika, sonrasında +4°C'de 10 dakika bekletilerek agarın katılaşması sağlanmıştır.

#### **3.6.2.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması**

1. Hazırlanan kalıplar, ze yardımıyla jel tutucudan çıkartılmış ve 5 ml hücre lizis tamponu içeren tüplerin içine konulmuştur. Tüplerin içerisine 25'er µl proteinaz K (20 mg/ml Thermo Scientific, ABD) eklenmiştir.
2. Tüpler çalkalayıcılı su banyosuna (GFL, Almanya) yerleştirilmiş ve bir gece 45°C'de inkübe edilmiştir.

#### **3.6.2.4. Agaroz Kalıpların Yıkamaı**

1. Hücre lizis tamponu dökülerek, 5-10 ml ultra saf su ile 2 kez 30'ar dakika boyunca çalkalayıcıda (HVD, Avusturya) yıkama işlemleri gerçekleştirilmiştir.
2. Ultra saf su dökülerek 5-10 ml TE tamponu ile her biri 30'ar dakika olmak üzere 4 kere daha yıkanmıştır. İki yıkama işlemleri arasında, her seferinde TE tamponu dökülerek yenisi ile devam edilmiştir. Kesim enzimi ile muamele edilinceye kadar 5 ml TE içinde 4 °C'de saklanmıştır.

#### **3.6.2.5. DNA'nın Restriksiyon Enzimiyle Kesilmesi**

1. Mikrosantrif tüplerine, her birinde 180 µl su + 20 µl 10X buffer tango olacak şekilde tampon-su karışımı dağıtılmıştır.
2. Kesim işlemleri için kalıplar TE içeren tampondan çıkarılıp 3-4 mm kalınlıkta olacak şekilde kesilmiş ve tampon-su karışımı içeren mikrosantrif tüplerine konulmuştur ve 15 dakika bekletilmiştir.
3. Tampon su karışımı uzaklaştırılmış ve mikrosantrif tüplerine enzim-tampon-su karışımı (5 µl *Xba*I (Thermo Scientific, ABD) + 175 µl su + 20 µl 10X buffer tango)

konularak, 37°C’de ısıtıcı blokta (HVD, Avusturya) 4 saat süre ile bekletilmiştir. Süre bitiminde enzim-tampon-su karışımı da uzaklaştırılmıştır.

#### **3.6.2.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması**

1. % 1’ lik *pulsed-field certified* agaroz (Bio-Rad, ABD) kullanılarak jel hazırlanmıştır.
2. Bu amaçla agaroz dökülecek kaset, su terazisi ile kontrol edilmiş düzgün bir zemine yerleştirilmiştir.
3. Sonrasında 15 dişli tarak, jel dökülecek kaset üzerine yerleştirilmiş ve 45-50°C’ye kadar soğuması beklenen agaroz, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek kasete dökülmüştür.
4. Jelin katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir.
5. Jel katılaştıktan sonra tarak çekilmiştir.
6. 3-4 mm kalınlıkta kesilmiş olan agaroz kalıplar, kurutma kağıdı ile nazikçe kurutulduktan sonra, tarağın çekilmesiyle agar üzerinde oluşan kuyucuklara yerleştirilmiştir.
7. 15 kuyucuğun başına, ortasına ve sonuna ya da ortasına ve sonuna olacak şekilde Lambda Ladder PFGE Marker’dan (New England Biolabs, İngiltere) bistüri yardımıyla yaklaşık 1’er mm kalınlığında kesilen parçalar konulmuştur.
8. Kuyucuklara yerleştirilen agaroz kalıpların üstünde kalan boşluklar, kalan 3-5 ml PFGE jeli ile pipet yardımıyla doldurulmuştur.

9. Tabla üzerindeki agaroz jel, altındaki siyah destek ve dikdörtgen çerçeve ile içerisinde 1900 ml 0,5x TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirilmiştir.

#### **3.6.2.7. Elektroforez Sistemi**

PFGE için CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad, ABD) elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez şartları aşağıda belirtildiği gibidir:

**Başlangıç vuruş süresi:** 2,2 sn

**Bitiş vuruş süresi:** 63,8 sn

**Vuruş açısı:** 120°

**Akım:** 6 V/cm<sup>2</sup>

**Sıcaklık:** 14 °C

**Süre:** 18 saat

#### **3.6.2.8. Jelin Boyanması**

1. Elektroforez sonrasında jel, 30 µl etidyum bromid içeren 300 ml ultra saf su ile 30 dakika boyanmıştır.
2. Sonrasında jel 400 ml ultra saf su içerisinde 90 dakika 2–3 kere suyu değiştirilerek yıkanmıştır ve böylece DNA'ya bağlanmamış boya uzaklaştırılmıştır.

3. UV Transillüminatör (Vilber – LourmatTFX–20.M (ETX–20 M), Fransa) altında bantlarının fotoğrafı fotoğraf makinesi (Canon Power Shot G5, Kanada) ile çekilmiş ve kayıt edilmiştir.

### **3.6.2.9. Sonuçların Değerlendirilmesi**

Elektroforez jel görüntüsünde her bir izolata ait bant profili hem görsel olarak Tenover ve arkadaşlarının (1997) tarifledikleri kriterler doğrultusunda, hem de GelCompar II (Applied Biosystems, Belçika) programı kullanılarak analiz edilmiştir. UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak PFGE profillerinin dendogramları oluşturulmuş ve kümelenme analizi yapılmıştır. Değerlendirmede tolerans % 1 olarak alınmıştır. PFGE bant profilleri incelendiğinde aralarında 7 ve üzerinde bant farkı olan ve dendogram analizinde % 70'in altında benzerlik bulunan izolatlar birbiriyle ilişkisiz; 4-6 bant farkı bulunan ve % 70-80 arası benzerlik bulunan izolatlar muhtemel ilişkili; 2-3 bant farkı ve % 80'in üzerinde benzerlik bulunan izolatlar yakın ilişkili ve aralarında hiç bant farklılığı bulunmayan izolatlar ise ayırt edilemez izolatlar olarak değerlendirilmiştir (Stephens ve ark., 2007).

### **3.7. Verilerin Analizi ve İstatistiksel Değerlendirme**

Elde edilen verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler dağılımı normal olan değişkenler için ortalama  $\pm$  standart sapma, dağılımı normal olmayan değişkenler için median (min – maks), nominal değişkenler ise vaka sayısı ve % olarak gösterilmiştir.

İki yöntem arasındaki uyum karşılaştırması için kappa uyum katsayısı ve anlamlılığı araştırılmıştır. Duyarlılık, seçicilik, doğruluk oranı, yanlış negatif, yanlış pozitif oranları ve bu değerlere ilişkin % 95 güven aralıkları hesaplanmıştır.

Kategorik değişkenler arasındaki farkın anlamlılığı Pearson Ki-Kare veya Fisher Exact testi ile değerlendirilmiştir.  $p < 0,05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Bakteri İzolatlarının Genel Özellikleri

Çalışmaya her bir klinik örnekten izole edilen tek bir bakteriyel izolat dahil edilerek toplam 112 ayrı hastadan alınan klinik örneklerden tanımlanan 112 izolat incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların 62 tanesi (% 55,4) kadın, 50 tanesi (% 40,6) erkek hastalara aittir.

Örneklerin kliniklere göre dağılımı incelendiğinde sırasıyla cerrahi klinikler (% 40), reanimasyon ünitesi (% 26), dahili klinikler (% 17), cerrahi yoğun bakım üniteleri (% 12) ve dahili yoğun bakım üniteleri (% 5) gelmektedir (Şekil 4.1).

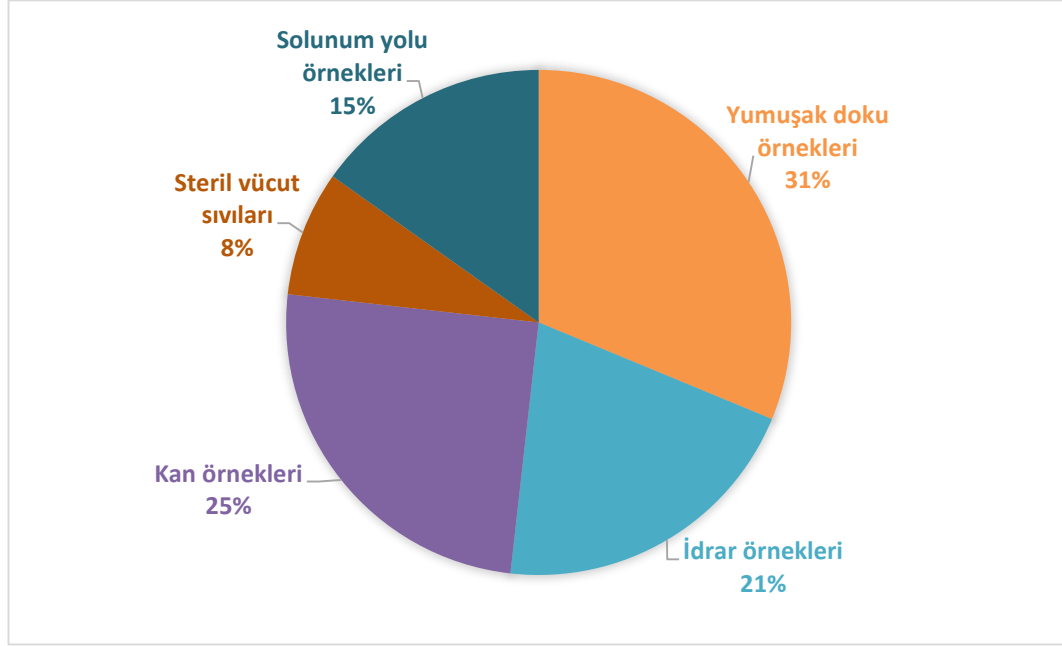


Şekil 4. 1. İncelenen örneklerin kliniklere göre dağılımı

112 örneğin 48 tanesi (% 42,9) yoğun bakım ünitelerinden; 64 tanesi (%57,1) yoğun bakım dışı bölümlerden gönderilmiştir.

Örneklerin 107 tanesi (% 95,5) yatan hastalardan gönderilen örneklerden, beş tanesi ise (% 4,5) poliklinik hastalarından gönderilen örneklerden oluşmaktadır.

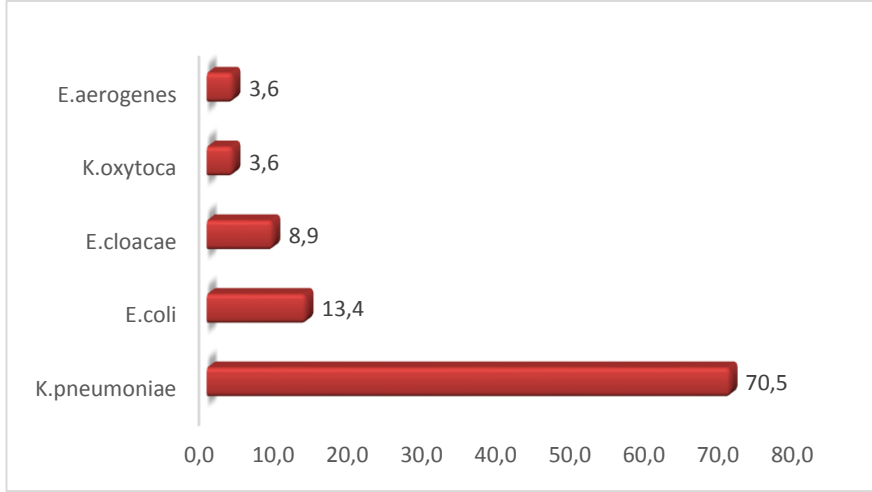
Örneklerin çoğunluğunu yumuşak doku örnekleri oluştururken (% 31,3), bunu sırasıyla kan örnekleri (% 25), idrar örnekleri (% 20,5), solunum yolu örnekleri (% 15,2) ve steril vücut sıvıları (% 8) takip etmektedir (Şekil 4.2).



Şekil 4. 2. Örnek türlerine göre dağılım

59 örnek (% 51,3) invaziv yöntemlerle elde edilmişken 56'sı (% 48,7) non-invaziv örneklerden oluşmaktadır.

112 klinik örnekten elde edilen 112 bakteriyel izolatın çoğunluğunu *K. pneumoniae* (% 70,5) oluşturmakta iken bunu sırasıyla *E. coli* (% 13,4), *E. cloacae* (% 8,9), *E. aerogenes* (% 3,6) ve *K. oxytoca* (% 3,6) takip etmiştir (Şekil 4.3).

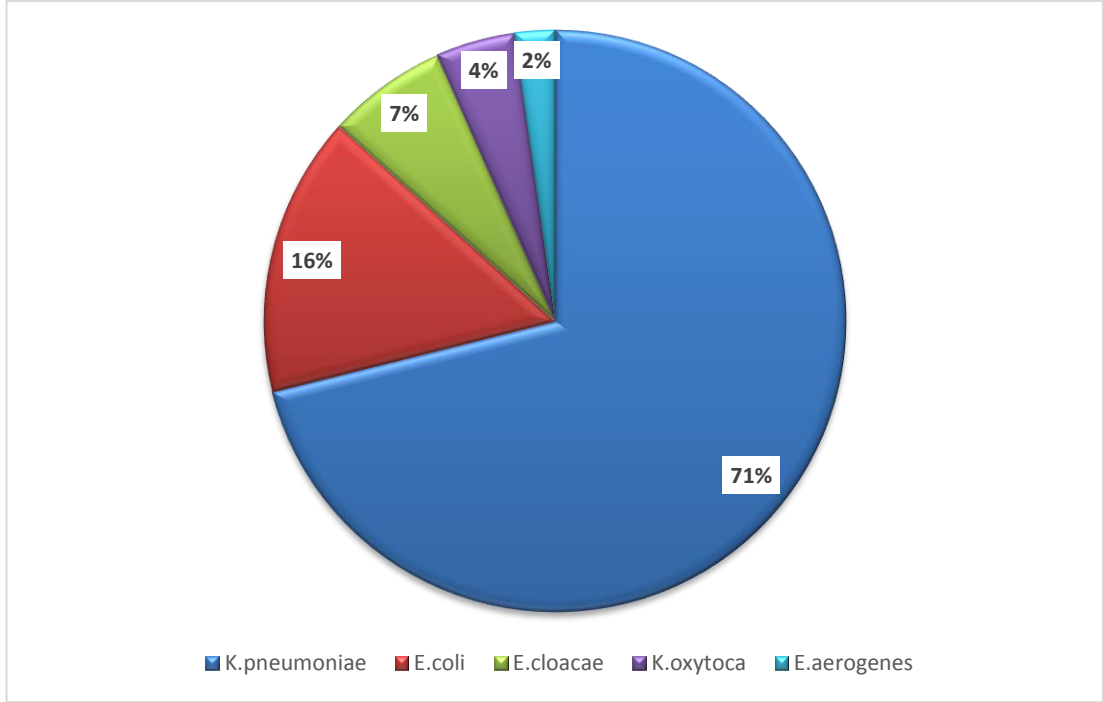


**Şekil 4. 3.** Örneklerden izole edilen bakterilerin türlere göre dağılımı

#### **4.2. Bakteri İzolatlarında Karbapenemaz Genlerinin Varlığı ve Sıklığı**

İzolatlarda en sık olarak OXA-48 geninin varlığı saptanmıştır. Bakteriyel izolatların 83 tanesinde (% 74,1) tek başına, yedi tanesinde ( % 6,3) ise VIM geni ile birlikte OXA-48 tespit edilmiştir.

OXA-48 üreticilerinin % 71'ini *K. pneumoniae* türü bakteriler oluşturmakta iken % 16'sı *E. coli*, % 7'si *E. cloacae*, % 4'ü *K. oxytoca* ve % 2'si *E. aerogenes* türlerine aittir (Şekil 4.4).



Şekil 4. 4. OXA-48 üreten izolatların bakteri türlerine göre dağılımı

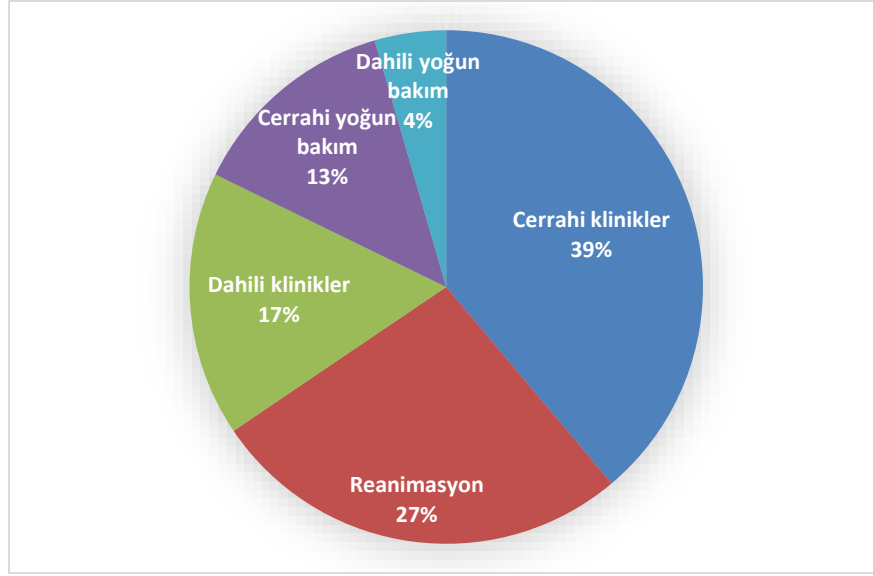
*K. pneumoniae* izolatlarının 64 tanesinde (% 81) OXA-48 pozitifliği saptanırken 15 tanesinde (% 19) OXA-48 geni negatif bulunmuştur. *E. coli* izolatlarında OXA-48 pozitifliği 15 izolatın 14'ünde (% 93,3) gözlenirken *E. cloacae* izolatlarında % 60, *E. aerogenes* izolatlarında % 50 ve *K. oxytoca* izolatlarında % 100 oranında OXA-48 pozitifliği saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Karbapenemaz genlerinin türler arasında dağılımı

|                            | OXA-48         |      | VIM            |       | NDM          |       | OXA-48<br>+VIM |       |
|----------------------------|----------------|------|----------------|-------|--------------|-------|----------------|-------|
|                            | +              | -    | +              | -     | +            | -     | +              | -     |
| <b><i>K.pneumoniae</i></b> | 64             | 15   | 5              | 74    | 2            | 77    | 4              | 75    |
|                            | %81            | %19  | %6,3           | %93,7 | %2,5         | %97,5 | %5,1           | %94,9 |
| <b><i>E.coli</i></b>       | 14             | 1    | 2              | 13    | 0            | 15    | 2              | 13    |
|                            | %93,3          | %6,7 | %13,3          | %86,7 | %0           | %100  | 13,3           | 86,7  |
| <b><i>E.cloacae</i></b>    | 6              | 4    | 2              | 8     | 0            | 10    | 1              | 9     |
|                            | %60            | %40  | %20            | %80   | %0           | %100  | %10            | %90   |
| <b><i>E.aerogenes</i></b>  | 2              | 2    | 0              | 4     | 0            | 4     | 0              | 4     |
|                            | %50            | %50  | %0             | %100  | %0           | %100  | %0             | %100  |
| <b><i>K.oxytoca</i></b>    | 4              | 0    | 0              | 4     | 0            | 4     | 0              | 4     |
|                            | %100           | %0   | %0             | %100  | %0           | %100  | %0             | %100  |
| <b><i>P değeri</i></b>     | <i>p=0,117</i> |      | <i>p=0,367</i> |       | <i>p=1,0</i> |       | <i>p=0,570</i> |       |

OXA-48 üreticilerinin türlere göre dağılımında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.117) (Çizelge 4.1).

OXA-48 üreticilerinin kliniklere göre dağılımı incelendiğinde en sık olarak reanimasyon ünitesinden (% 27) izole edildiği görülmüştür (Şekil 4.5).



Şekil 4. 5. OXA-48 üreticilerinin izole edildikleri kliniklere göre dağılımı

OXA-48 pozitif izolatlar herhangi bir klinikte anlamlı düzeyde yüksek bulunmamıştır ( $p>0,05$ ). OXA-48 varlığı açısından yoğun bakım ve yoğun bakım dışı bölümler arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.2).

Çizelge 4. 2. Karbapenemaz genlerinin yoğun bakım üniteleri ve yoğun bakım dışı bölümler arasındaki dağılımı

|                                  | OXA-48    |       | VIM      |       | NDM       |       | OXA-48 +VIM |      |
|----------------------------------|-----------|-------|----------|-------|-----------|-------|-------------|------|
|                                  | +         | -     | +        | -     | +         | -     | +           | -    |
| <b>Yoğun Bakım Üniteleri</b>     | 40        | 8     | 0        | 48    | 0         | 48    | 0           | 48   |
|                                  | %83,3     | %16,7 | %0       | %100  | %0        | %100  | %0          | %100 |
| <b>Yoğun Bakım Dışı Bölümler</b> | 50        | 14    | 9        | 55    | 2         | 62    | 7           | 57   |
|                                  | %78,1     | %21,9 | %14,1    | %85,9 | %95,3     | %96,9 | 10,9        | 89,1 |
| <b>P değeri</b>                  | $p=0,632$ |       | $p=0,01$ |       | $p=0,634$ |       | $p=0,017$   |      |

Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta VIM geninin varlığı saptanmış olup toplam dokuz bakteri türünde (% 8) pozitif olarak bulunmuştur. Bunlardan yedi tanesinde aynı zamanda OXA-48 geni de pozitif bulunmuştur. Diğer iki tanesinde ise sadece VIM geni pozitif olarak belirlenmiştir.

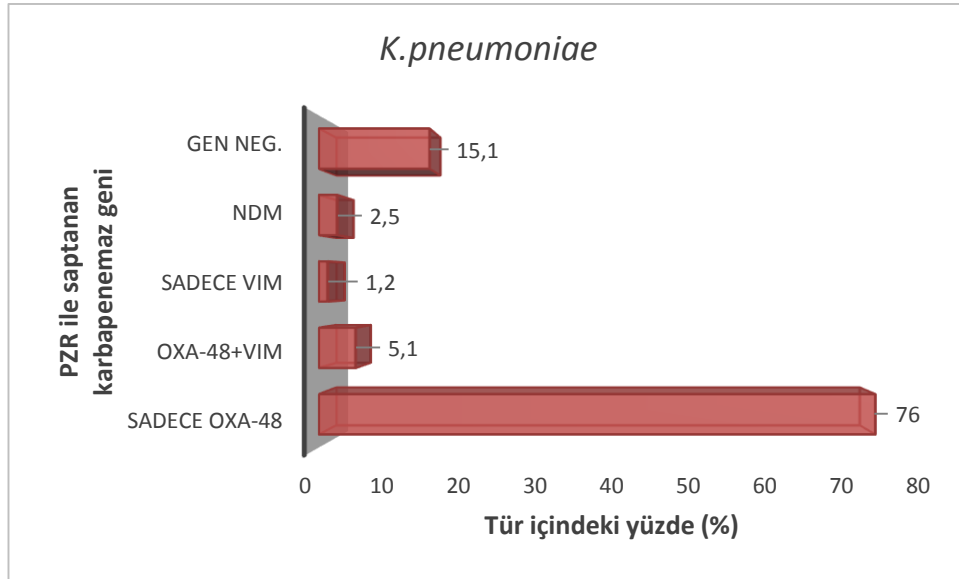
VIM üreticilerinin beş tanesini (% 55,6) *K. pneumoniae* türü bakteriler oluşturmakta iken iki *E. coli* izolatında (% 22,2) ve iki *E. cloacae* izolatında (% 22,2) VIM pozitifliği saptanmıştır. *E. aerogenes* ve *K. oxytoca* izolatlarında VIM pozitifliğine rastlanmamıştır.

VIM üreticilerinin tamamının yoğun bakım dışı bölümlerden izole edildiği saptanmış olup bu yüksekliğin istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulunmuştur ( $p=0,01$ ) (Çizelge 4.2). Bu mikroorganizmaların PFGE paternleri incelendiğinde klonal olarak ilişkili olmadıkları görülmüştür. Klinik örneklerinden VIM tipi karbapenemaz tanımlanan hastaların epikrizleri de incelenmiştir. Hastalardan birinin 10 gün kadar iç hastalıkları yoğun bakım ünitesinde kaldığı, daha sonra nefroloji kliniğine devredildiği, VIM geni tanımlanan klinik örneğin ise hastanın nefroloji kliniğine yatışının sekizinci gününde gönderildiği belirlenmiştir. Bir hasta ise pnömoni ön tanısıyla acil servise başvurmuş ve yatışının ertesi günü idrar kültüründe VIM geni pozitif *E. coli* izolatı tanımlanmıştır. Hastanın anamnezinde 20 gün kadar önce bir diğer dış merkezde opere olduğu bildirilmiştir. Diğer bir hastanın ise ortopedi polikliniğinde muayenesi sırasında gönderilen yara örneğinde OXA-48 ve VIM geni pozitif *K. pneumoniae* izolatı tanımlanmıştır. Hastanın anamnezinde ise iki ay önce ortopedi kliniğimizde opere edildiği bilgisi yer almaktadır.

Çalışmamızda en az sıklıkta saptanan karbapenemaz geni NDM olup iki bakteriyel izolatta (% 1,8) tanımlanmıştır. NDM geninin saptandığı her iki izolat da *K. pneumoniae* türündedir. NDM üreticilerinden biri kardiyoloji bölümünden gönderilen bir idrar örneğinde saptanırken diğeri ise beyin cerrahisi bölümünden gönderilen bir kan örneğinden elde edilmiştir.

*K. pneumoniae* izolatlarında saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde bu türde en sık olarak OXA-48 varlığı (% 81) görülmektedir. İkinci sırada VIM pozitifliği (% 6,3) görülürken NDM geni iki izolatta (% 2,5)

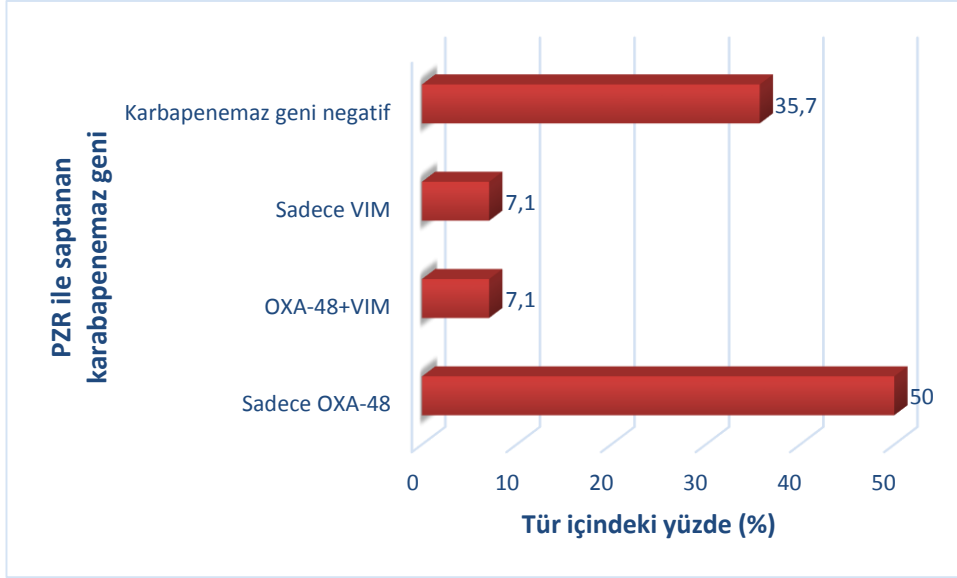
saptanmıştır. 12 izolatta (% 15,1) ise herhangi bir karbapenemaz geni varlığına rastlanmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4. 6. *K. pneumoniae* izolatlarında PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı

*E.coli* izolatlarında saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde bu türde en sık olarak OXA-48 varlığı görülmektedir. 15 izolatın 14'ünde OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. 14 izolatın ikisinde OXA-48'in yanı sıra VIM pozitifliği de görülmüştür. Bir izolatta ise herhangi bir karbapenemaz geninin varlığına rastlanmamıştır.

Enterobacter türlerinde (*E. cloacae* ve *E. aerogenes* birlikte) saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde bu türde de en sık olarak OXA-48 varlığı görülmektedir. OXA-48 pozitif sekiz izolatın yedi tanesi tek başına OXA-48 üreticisi iken bir tanesinde aynı zamanda VIM geni de saptanmıştır. Bir izolatta sadece VIM geni saptanırken beş izolatta ise herhangi bir karbapenemaz genine rastlanmamıştır (Şekil 4.7).



Şekil 4. 7. Enterobacter türlerinde PZR ile saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı

Çalışmaya dahil edilen dört *K. oxytoca* izolatının tamamında sadece OXA-48 varlığı saptanmıştır.

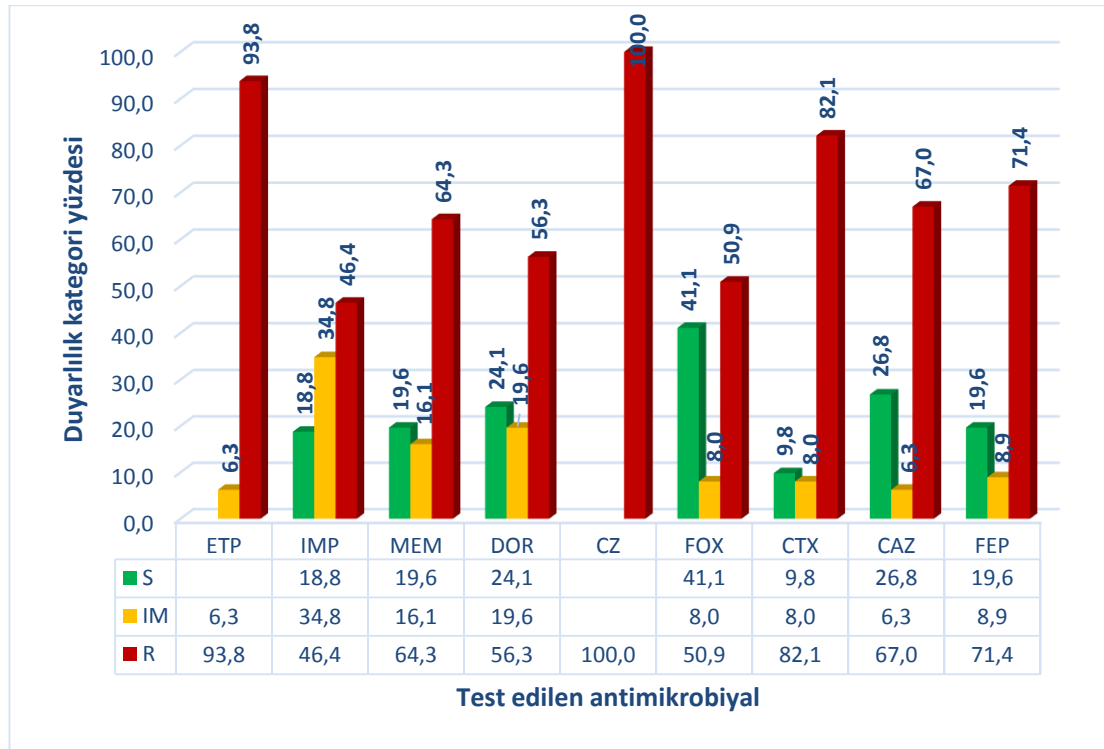
Çalışmamızda 18 izolatta (% 16,1) 11 karbapenemaz geninden hiçbirini saptanmamıştır. Bunların 12 tanesi (% 66,7) *K. pneumoniae* türünde iken üç tanesi (% 16,7) *E. cloacae*, iki tanesi (% 11,1) *E. aerogenes* ve bir tanesi (% 5,6) *E. coli* türlerine aittir.

#### 4.3. Bakteri İzolatlarında Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları ve Karbapenemaz Genleri ile İlişkisi

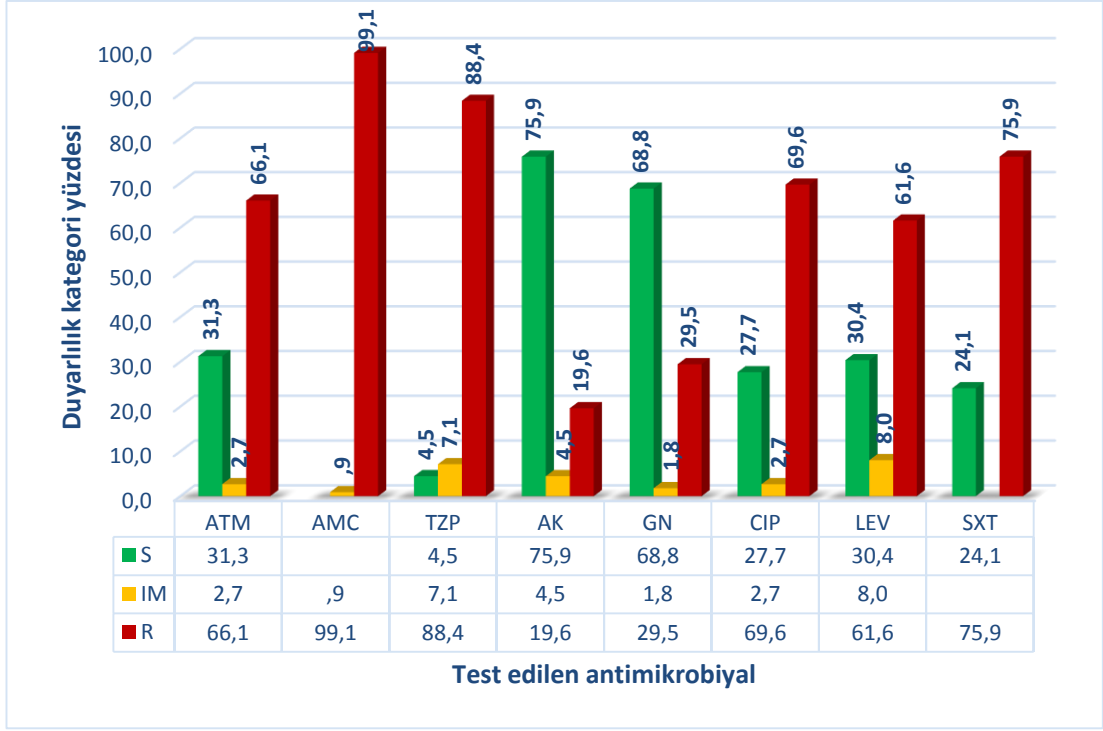
##### 4.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Çalışmamıza dahil ettiğimiz *Enterobacteriaceae* üyelerinin duyarlılık paternlerini belirlemek için 17 farklı antibiyotik diski kullanılmıştır. Test edilen tüm izolatlara için en yüksek direnç gözlenen antimikrobiyal ajanlar sefazolin (% 100) ve

amoksisilin-klavulanik asit (% 99,1) olmuştur. En az direnç gözlenen antimikrobiyal ajanlar ise amikasin (% 19,6) ve gentamisin (% 29,5) olmuştur. Disk difüzyon yönteminde ertapeneme duyarlı olmayan izolatların dahil edildiği çalışmamızda ertapenem orta duyarlı ya da dirençli iken diğer karbapenemlere direnç oranları imipenem için % 46,4; meropenem için % 64,3; doripenem içinse % 56,3 olarak bulunmuştur. Kinolonlara direnç oranları siprofloksasin ve levofloksasin için sırasıyla % 69,6 ve % 61,6 bulunmuştur. Sefoksitin direnci % 50,9 izolatta görülürken üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç sefotaksim için % 82,1; seftazidim içinse % 67 oranında saptanmıştır. Dördüncü kuşak sefalosporinlerden test edilen sefepim için direnç oranı % 71,4 bulunmuştur. Piperasilin-tazobaktam, trimetoprim-sulfametoksazol ve aztreonam için direnç oranları ise sırasıyla % 88,4; % 75,9 ve % 66,1 olmuştur (Şekil 4.8 ve 4.9).

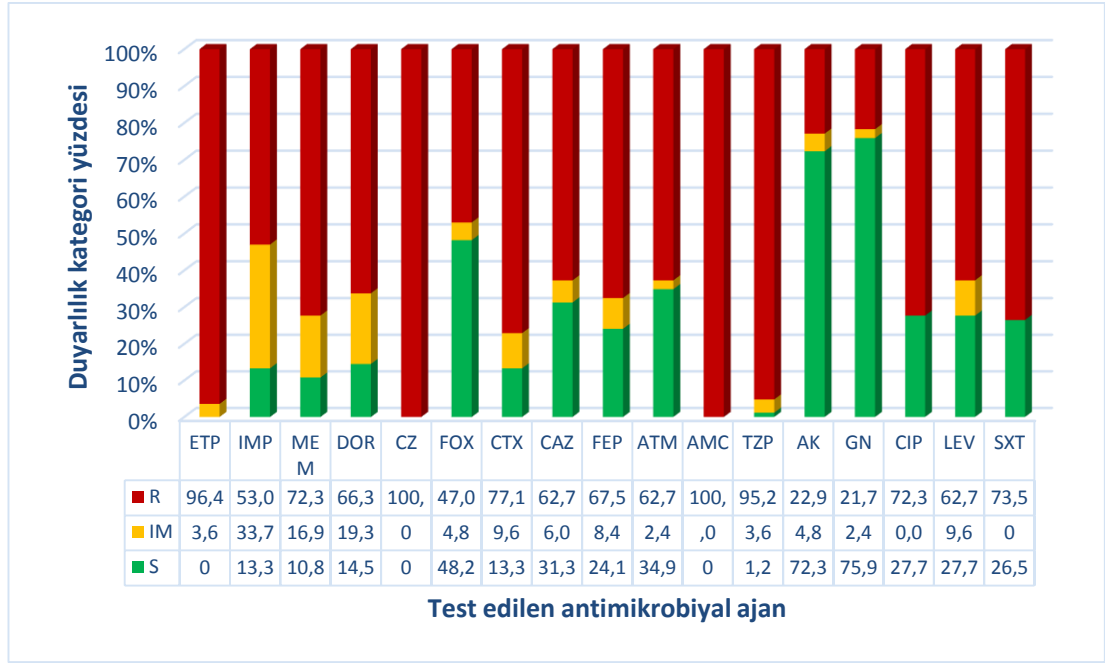


Şekil 4. 8. İzolatların karbapenem ve sefalosporin grubu antimikrobiyaller için duyarlılık kategorileri

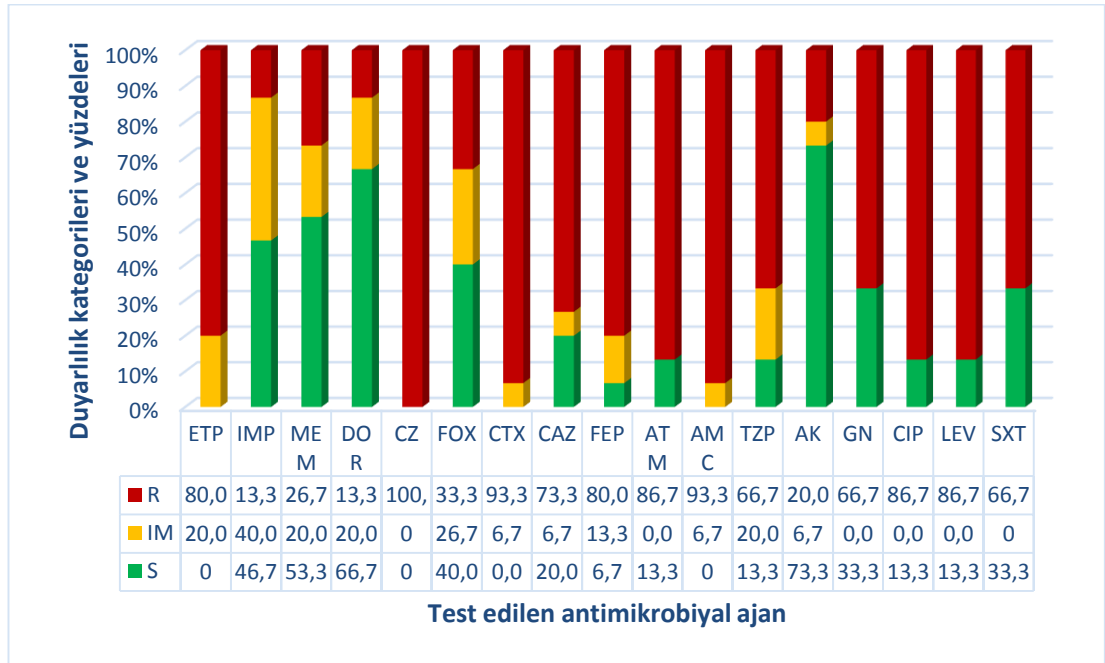


**Şekil 4. 9.** İzolatların monobaktam, aminoglikozit, kinolon ve diğer antimikrobiyaller için duyarlılık kategorileri

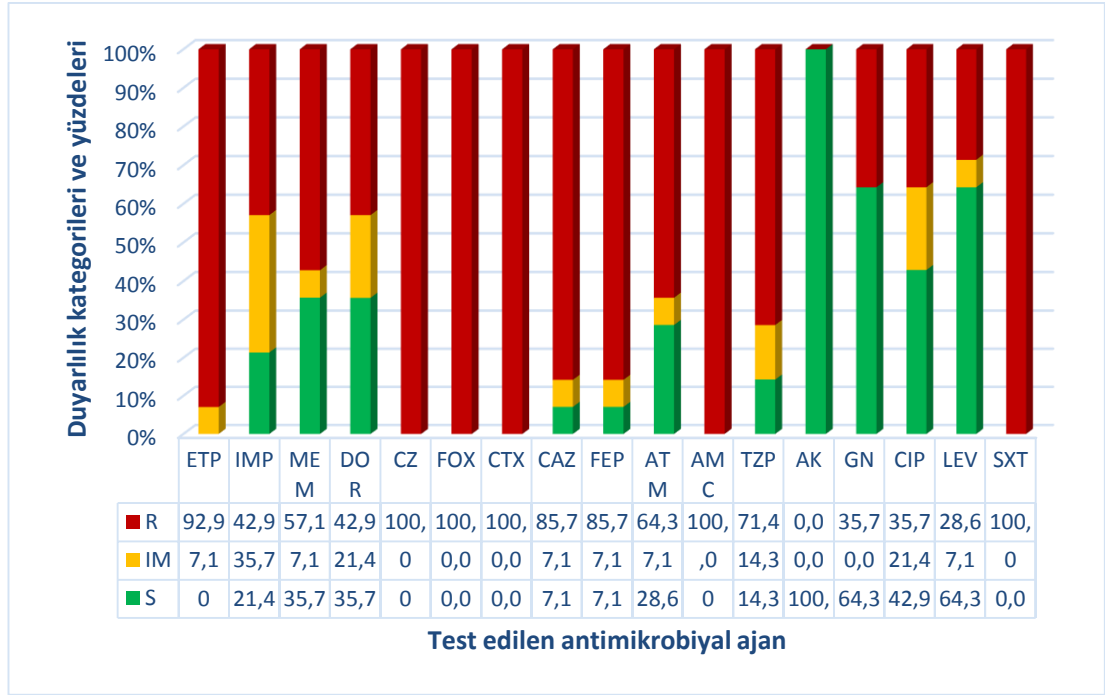
Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de sırasıyla *Klebsiella* türleri, *E. coli* ve *Enterobacter* türleri için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle elde edilen antimikrobiyal direnç oranları verilmiştir.



Şekil 4. 10. Klebsiella türleri için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları



Şekil 4. 11. E. coli izolatları için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları



**Şekil 4. 12.** Enterobacter türleri için Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları

Klebsiella türlerinde piperasilin-tazobaktam direnci, diğer türlere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ( $p=0,002$ ) (Çizelge 4.3).

Karbapenemler için *E. coli* suşlarında direnç anlamlı oranda düşük bulunmuştur ve p değerleri imipenem için  $p=0,014$ ; meropenem için  $p=0,001$  ve doripenem için  $p<0,001$  olarak belirlenmiştir. Gentamisin içinse *E. coli* suşları daha yüksek direnç göstermektedir ( $p=0,01$ ). *E. coli* izolatlarında aztreonam için de diğer türlere göre daha yüksek oranda direnç gözlenmesine rağmen bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ( $p>0,05$ ) (Çizelge 4.3).

Enterobacter türlerinde kinolonlara direnç, diğer türlere göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ve p değerleri siprofloksasin ve levofloksasin için sırasıyla 0,001 ve 0,018 olarak hesaplanmıştır. Trimetoprim-sulfametoksazol içinse Enterobacter türleri daha dirençli gözlenmektedir ( $p=0,044$ ). Diğer antibiyotiklere dirençle ilgili türlere göre anlamlı fark gözlenmemiştir (Çizelge 4.3).

Çizelge 4. 3. Bakteri türlerinin antimikrobiyal ajanlara direnç yüzdeleri

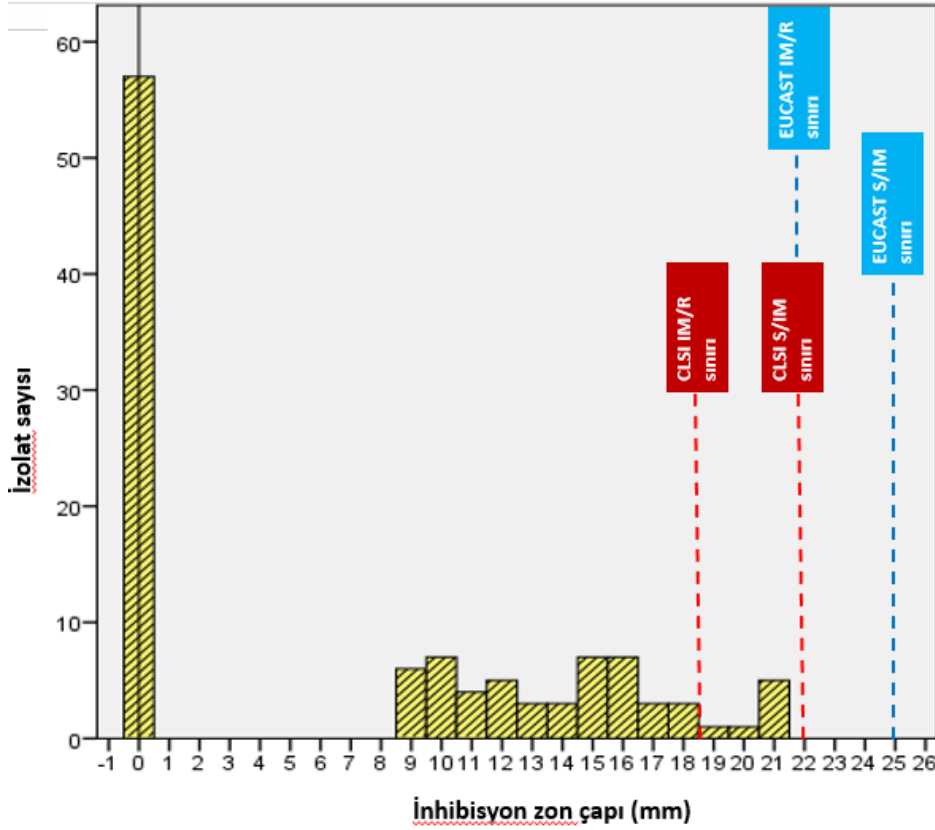
|                    | <b>Klebsiella spp.</b> | <b>E.coli</b> | <b>Enterobacter spp.</b> | <b>p değeri</b> |
|--------------------|------------------------|---------------|--------------------------|-----------------|
| <b>ETP direnci</b> | % 96,4                 | % 80          | % 92,9                   | 0,048           |
| <b>IMP direnci</b> | % 53,3                 | % 13,3        | % 42,9                   | 0,014           |
| <b>MEM direnci</b> | % 72,3                 | % 26,7        | % 57,1                   | 0,001           |
| <b>DOR direnci</b> | % 66,3                 | % 13,3        | % 42,9                   | <0,001          |
| <b>FEP direnci</b> | % 67,5                 | % 80          | % 85,7                   | 0,35            |
| <b>LEV direnci</b> | % 62,7                 | % 86,7        | % 28,6                   | 0,018           |
| <b>CIP direnci</b> | % 72,3                 | % 86,7        | % 35,7                   | 0,001           |
| <b>FOX direnci</b> | % 47                   | % 33          | % 100                    | <0,001          |
| <b>AMC direnci</b> | % 100                  | % 93,3        | % 100                    | 0,259           |
| <b>CAZ direnci</b> | % 62,7                 | % 73,3        | % 85,7                   | 0,318           |
| <b>ATM direnci</b> | % 62,7                 | % 86,7        | % 64,3                   | 0,282           |
| <b>CZ direnci</b>  | % 100                  | % 100         | % 100                    | *               |
| <b>AK direnci</b>  | % 22,9                 | % 20          | % 0                      | 0,207           |
| <b>GN direnci</b>  | % 21,7                 | % 66,7        | % 35,7                   | 0,01            |
| <b>SXT direnci</b> | % 73,5                 | % 66,7        | % 100                    | 0,044           |
| <b>TZP direnci</b> | % 95,2                 | % 66,7        | % 71,4                   | 0,002           |
| <b>CTX direnci</b> | % 77,1                 | % 93,3        | % 100                    | 0,261           |

\*CZ için izolatların tamamı %100 direnç gösterdiği için p değeri hesaplanmamıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile karbapenem grubu antibiyotiklerin etrafında ölçülen inhibisyon zon çaplarının dağılımları Şekil 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da görülmektedir.

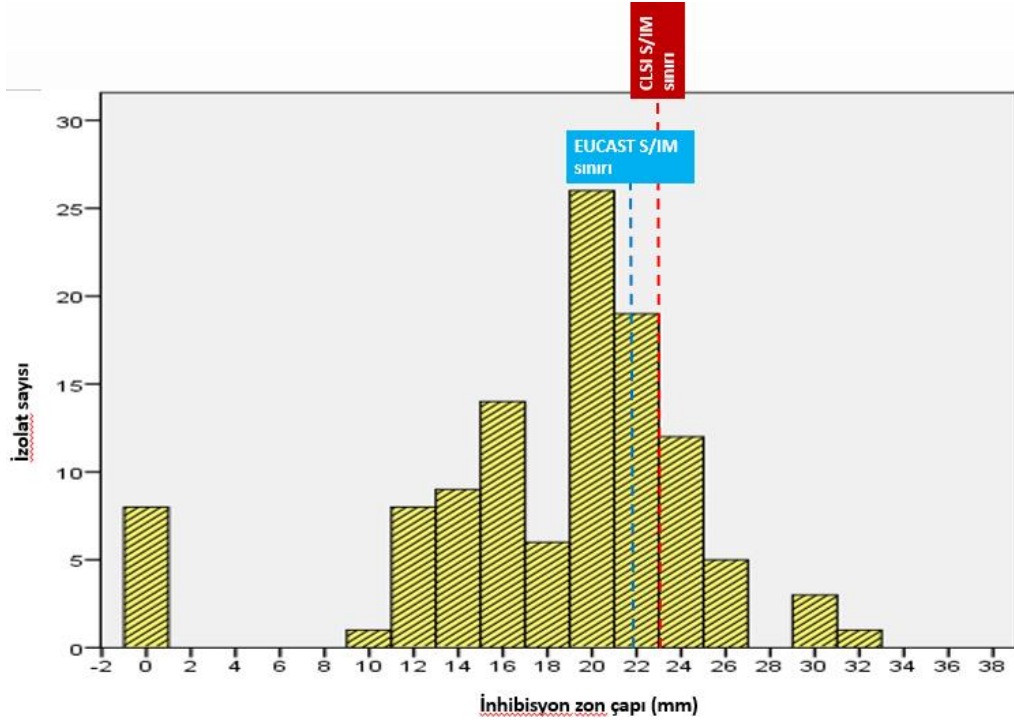
Ertapenem için CLSI (2015), 22 mm ve üzerini duyarlı kabul ederken EUCAST (2015) kılavuzunda bu değer 25 mm ve üzeri olarak belirlenmiştir. CLSI’da (2015) 19 mm’nin altı dirençli kabul edilirken EUCAST’ta (2015) bu değer 22 mm’nin altıdır. Kılavuzlardaki sınır değer farklılıklarından dolayı CLSI’nın

(2015) orta duyarlı kabul ettiği yedi tane izolat, EUCAST (2015) kılavuzuna göre dirençli olmaktadır (Şekil 4.13).



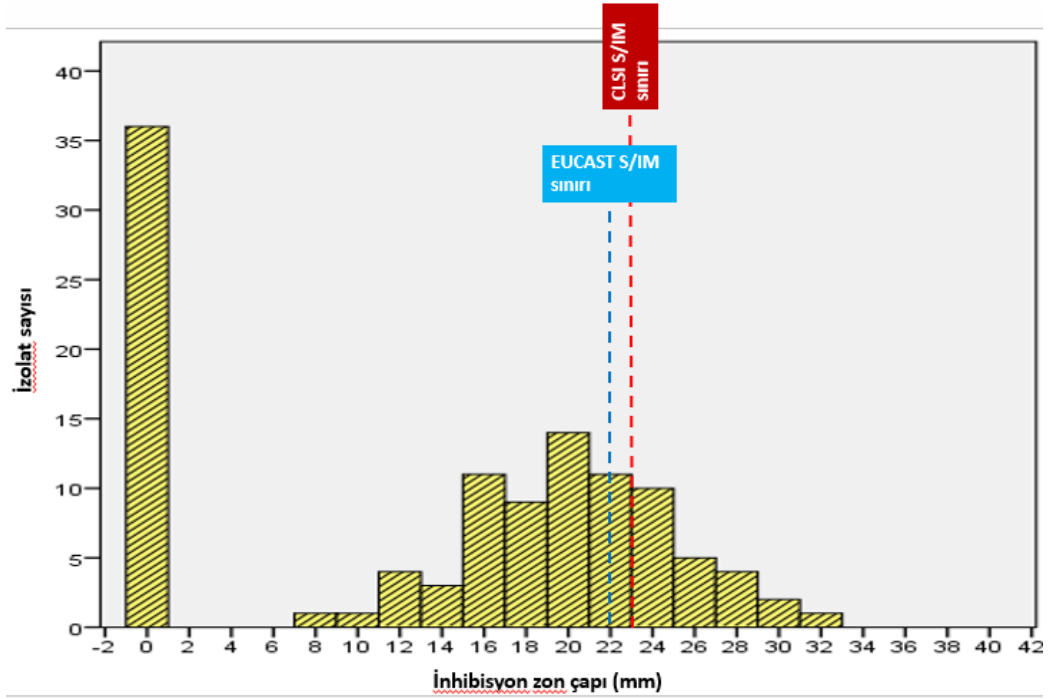
Şekil 4. 13. Ertapenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı

İmipenem için CLSI (2015) kılavuzunda belirlenen duyarlılık sınır değeri 23 mm ve üzeri olup EUCAST'e (2015) göre daha yüksektir. EUCAST'te (2015) bu değer 22 mm ve üzeri kabul edildiğinden bu kılavuza göre duyarlı kabul edilen sekiz tane izolat, CLSI'ya (2015) göre orta duyarlı olmaktadır. 21 tane izolat ise EUCAST'e (2015) göre orta duyarlı iken CLSI (2015) kriterlerine göre dirençli bulunmuştur (Şekil 4.14).



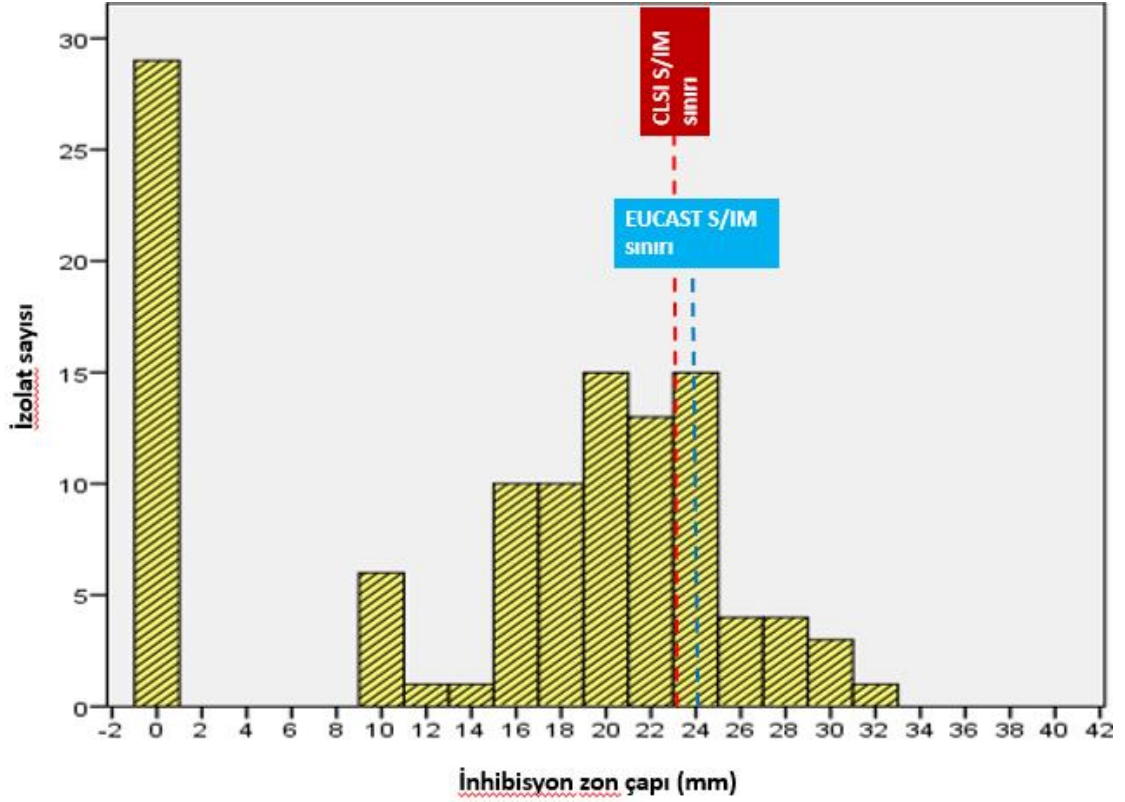
Şekil 4. 14. İmipenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı

Meropenem zon çapı sınır değerleri de imipenemle aynı olup CLSI'da (2015) 23 mm ve üzeri duyarlı, 20 mm'nin altı dirençli kabul edilirken EUCAST'te (2015) 22 mm ve üzeri duyarlı, 16 mm'nin altı ise dirençli olarak raporlanmaktadır. EUCAST (2015) kılavuzuna göre duyarlı bulunan yedi tane izolat, CLSI'ya (2015) göre orta duyarlı; EUCAST'e (2015) göre orta duyarlı bulunan 21 tane izolat ise CLSI'ya (2015) göre dirençli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4. 15. Meropenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı

Doripenemde ise duyarlılık sınır değeri EUCAST (2015) kılavuzunda daha yüksek belirlenmiş ve 24 mm ve üzeri duyarlı kabul edilmiştir. Bu değer CLSI (2015) içinse imipenem ve meropenemle aynı olarak 23 mm ve üzeridir. Böyle olunca doripenem diski etrafındaki inhibisyon zon çapı 23 mm ölçülen 10 tane izolat EUCAST'e (2015) göre orta duyarlı kabul edilirken CLSI (2015) kılavuzuna göre duyarlı olmaktadır. Dokuz tane izolat ise CLSI'ya (2015) göre orta duyarlı iken aynı isolatlar EUCAST (2015) kriterlerine göre değerlendirildiğinde dirençli olarak belirlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4. 16. Doripenem diski etrafında oluşan inhibisyon zon çaplarının dağılımı

Saptanan karbapenemaz geni ile Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları karşılaştırıldığında OXA-48 pozitif bulunan izolatların piperasilin-tazobaktamı daha dirençli olduğu belirlenmiştir ( $p=0,048$ ). NDM üreticilerinde amikasin direnci diğerlerine göre yüksek oranda iken örnek sayısı az olduğu için istatistiksel olarak anlamlılık sınırının üzerinde bulunmuştur ( $p=0,056$ ). VIM geni pozitif izolatlar doripenem için daha duyarlı bulunmuştur ( $p=0,034$ ). Herhangi bir karbapenemaz geni saptanamayan izolatların antibiyotik direnç profillerinde anlamlı farklılık gözlenmemiştir.

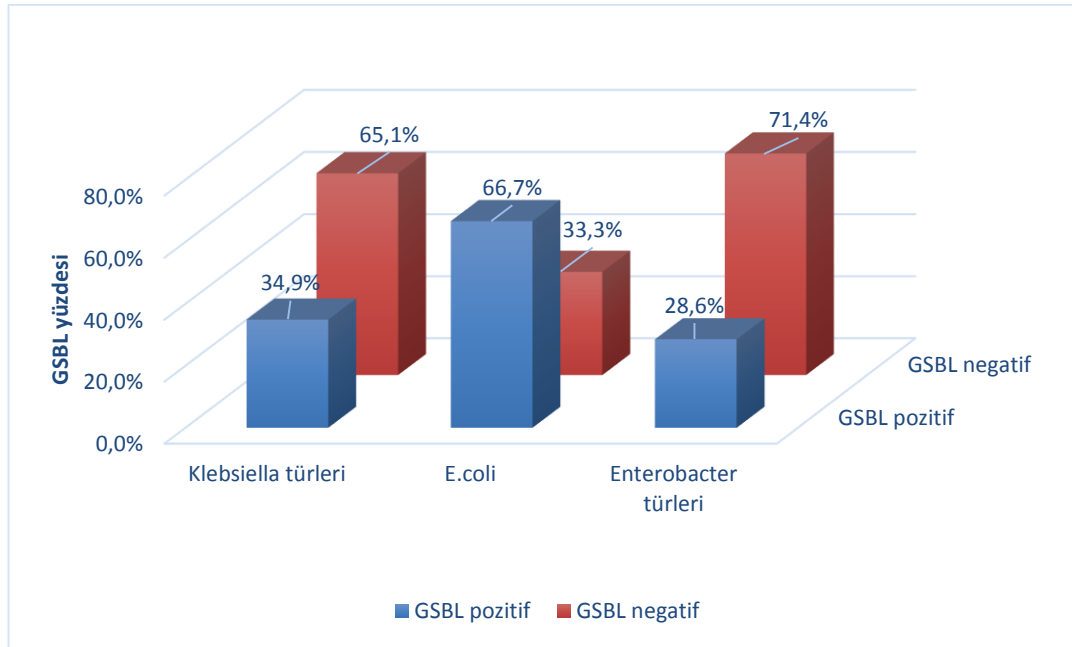
Kliniklere göre antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde yoğun bakım ünitelerinde kinolonlara anlamlı düzeyde direnç saptanmıştır (her ikisi için  $p<0,001$ ). Sefoksitin direnci de yoğun bakım ünitelerinde, yoğun bakım dışı bölümlere göre anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ( $p=0,024$ ).

Örnek tipi ile antibiyotik direnç profilleri arasındaki ilişki incelendiğinde invaziv örneklerde aztreonam ve seftazidim dirençleri anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ( $p$  değerleri sırasıyla 0,012 ve 0,049).

#### 4.3.2. GSBL Aranması

Çalışmaya dahil edilen 112 izolatın 43 tanesi (% 38,4) fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olarak saptanırken 69 tanesi (% 61,6) GSBL negatif olarak bulunmuştur.

79 *Klebsiella* türü izolatın 29'unda (% 34,9) GSBL pozitif bulunurken bu oran *E. coli* ve *Enterobacter* türleri için sırasıyla % 66,7 ve % 28,6 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.17). *E. coli* türlerinde GSBL oranı, diğer türlere göre daha yüksek bulunmuştur ( $p=0,05$ ).



Şekil 4. 17. GSBL pozitif izolatların bakteri türleri içindeki dağılım yüzdeleri

GSBL üreticilerinin % 81,4'ü aynı zamanda OXA-48 genine de sahiptir. GSBL üreticileri arasında VIM pozitifliği ise % 7 oranında görülmüştür.

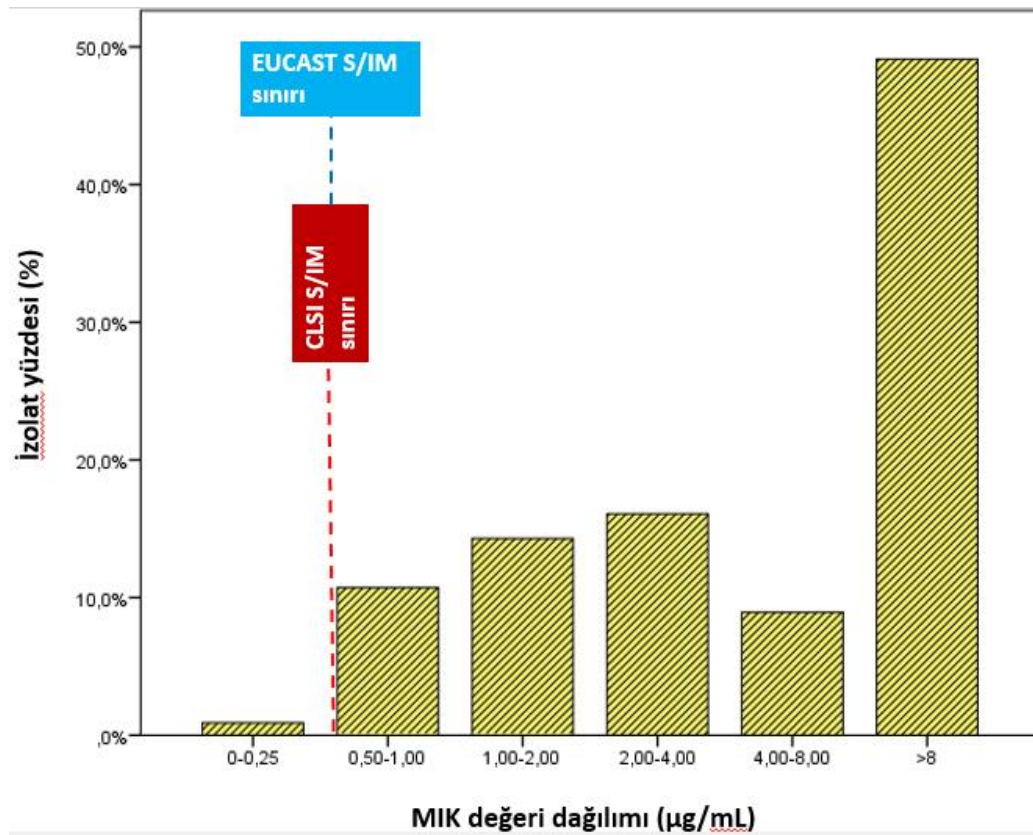
AmpC  $\beta$ -laktamazları aşırı eksprese eden izolatlarda GSBL maskelenmekte ve yalancı negatif sonuçlar elde edilmektedir. Böyle izolatlarda üçüncü kuşak sefalosporinlerin etrafında inhibisyon zonu olmaması ve sefamisinlere direnç varlığı önemli bir belirteç olmaktadır. (EUCAST web sayfası, erişim adresi:

[[www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms)], erişim tarihi: 15/06/2015). Çalışmamızda bu özelliklerdeki izolatlarla karşılaşılmış ve bunlar GSBL üretimi açısından şüpheli kabul edilmiştir. Fakat bu izolatlarda GSBL üretiminin doğrulanmasına yönelik herhangi bir test yapılmamıştır.

#### 4.3.3. Gradyent Difüzyon Testi

Ertapenem ve meropenem için gradiyent difüzyon testi gerçekleştirilmiş olup her iki antibiyotik için elde edilen MİK değerlerinin ve izolat yüzdelerinin dağılımı Şekil 4.18 ve 4.19’da görülmektedir.

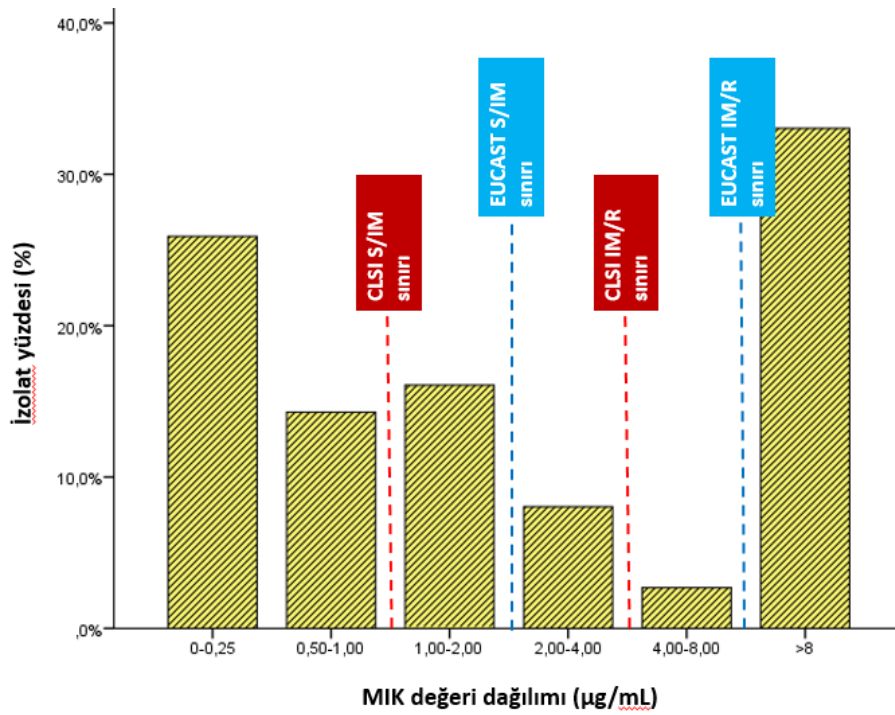
Ertapenem için CLSI (2015) ve EUCAST’ın (2015) kullandığı duyarlılık sınır değerleri uyumlu olduğundan izolatlar için elde edilen sonuçlar da uyumluluk göstermektedir.



Şekil 4. 18. Gradyent difüzyon yöntemi ile hesaplanan ertapenem MİK değerlerinin dağılım aralıkları

Meropenem için ise CLSI (2015) ve EUCAST'in (2015) kullandığı sınır değerler farklılık göstermektedir. CLSI (2015) kılavuzuna göre meropenem duyarlılık sınır değeri 1 µg/mL ve altı iken direnç sınırı 4 µg/mL ve üzeri olarak belirlenmiştir. EUCAST (2015) kılavuzundaysa 2 mg/L ve altı duyarlı, 8 mg/L'nin üzeri ise dirençli kabul edilmektedir.

Buna göre 24 izolat (% 21,4) EUCAST'e (2015) göre duyarlı iken CLSI'ya (2015) göre orta duyarlı; altı izolat (% 5,3) ise EUCAST'e (2015) göre orta duyarlı iken CLSI'ya (2015) göre dirençli olmaktadır.



**Şekil 4. 19.** Gradyent difüzyon yöntemi ile hesaplanan meropenem MIK değerlerinin dağılım aralıkları

Ertapenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile gradyent difüzyon yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında 99 izolat için her iki yöntemle elde edilen duyarlılık kategorileri birbirine uygun iken 12 izolatta uyumsuzluk gözlenmiştir (Çizelge 4.4).

**Çizelge 4. 4.** Ertapenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve gradiyent difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması

| Gradiyent difüzyon yöntemi |    |   |    |    |
|----------------------------|----|---|----|----|
| Disk difüzyon yöntemi      |    | S | IM | R  |
|                            | IM | 1 | 3  | 3  |
|                            | R  | 0 | 9  | 96 |

Meropenem için aynı karşılaştırma yapıldığında 71 izolat için her iki yöntemle elde edilen duyarlılık kategorileri birbirine uygun iken 41 izolatta uyumsuzluk gözlenmiştir (Çizelge 4.5).

Meropenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve gradiyent difüzyon yöntemi arasındaki uyum orta düzeyde bulunmuştur (0.40-0.59 arasında).

**Çizelge 4. 5.** Meropenem için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve gradiyent difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması

| Gradiyent difüzyon yöntemi |    |    |    |    |
|----------------------------|----|----|----|----|
| Disk difüzyon yöntemi      |    | S  | IM | R  |
|                            | S  | 20 | 2  | 0  |
|                            | IM | 10 | 8  | 0  |
|                            | R  | 15 | 14 | 43 |

Hem ertapenem için hem de meropenem için iki yöntem arasında uyumsuz sonuç elde edilen izolatlarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi daha dirençli sonuç verme eğilimindedir.

#### 4.4. Modifiye Hodge Testi Sonuçları

Modifiye Hodge testi, CLSI'nın (2015) önerdiği şekilde *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland türbiditedeki süspansiyonu hazırlanarak bunun 1:10 oranında sulandırımı (0,05 McFarland) kullanılarak yapılmıştır. Test, herhangi bir karbapenemaz geni pozitif bulunan 94 izolatın 87 tanesinde pozitif sonuç vermiştir. Kalan yedi tane izolatta ise modifiye Hodge testi yalancı negatif sonuç vermiştir. Karbapenemaz genleri açısından negatif bulunan 18 izolatın 16 tanesinde ise modifiye Hodge testi ile yalancı pozitif sonuç alınmıştır (Çizelge 4.6).

**Çizelge 4. 6.** Karbapenemaz geni pozitif/negatif bulunan izolatlarda modifiye Hodge testi (0.05 McFarland) ile alınan sonuçlar

|                    | 0.05 McFarland |     | Toplam |
|--------------------|----------------|-----|--------|
|                    | -              | +   |        |
| <b>Gen pozitif</b> | 7              | 87  | 94     |
| <b>Gen negatif</b> | 2              | 16  | 18     |
| <b>Toplam</b>      | 9              | 103 | 112    |

Modifiye Hodge testi ile yalancı negatif bulunan yedi izolattan altı tanesinde OXA-48 geni tek başına, bir tanesinde ise OXA-48 ve VIM geni birlikte pozitif bulunmuştur.

Modifiye Hodge testi ile yalancı pozitif bulunan 16 izolattan altı tanesi fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olarak belirlenmiştir.

Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği şekliyle 1:10 sulandırım kullanılarak yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6; özgüllüğü ise % 11,1 olarak hesaplanmıştır.

Farklı karbapenemaz genleri için testin duyarlılıkları incelendiğinde bu oran OXA-48 geni pozitif bulunan izolatlarda % 92,2; VIM pozitiflerde % 88,9; NDM pozitiflerde ise %100 olmaktadır (Çizelge 4.7). Metallo- $\beta$ -laktamazları yakalamada ise testin duyarlılığı % 91 olarak hesaplanmıştır.

**Çizelge 4. 7.** Değişik karbapenemaz genleri için modifiye Hodge testinin (0,05 McFarland) duyarlılık yüzdeleri

| <b>DUYARLILIK (%)</b> |      |
|-----------------------|------|
| <b>OXA-48</b>         | 92,2 |
| <b>VIM</b>            | 88,9 |
| <b>NDM</b>            | 100  |

Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği 1:10 oranında sulandırım adımı atlanarak *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland türbiditedeki süspansiyonu ile yapıldığında ise yalancı negatiflik sayısı üçe düşmüştür. Modifiye Hodge testi 1:10 sulandırım ile yapıldığında yalancı negatif sonuç alınan üç tane OXA-48 pozitif izolat ve bir tane OXA-48 ile VIM birlikte pozitif bulunan izolat, sulandırım adımı atlanarak yapıldığında pozitif sonuç vermiştir. Testi değerlendirirken araştırılan izolatın inhibisyon zonuna doğru yaptığı hafif girintiler de pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir. Buna göre testin duyarlılığı % 96,8'e yükselmiştir (Çizelge 4.8).

**Çizelge 4. 8.** Karbapenemaz geni pozitif/negatif bulunan izolatlarda modifiye Hodge testi (0,5 McFarland) ile alınan sonuçlar

|                    | <b>0.5 McFarland</b> |          | <b>Toplam</b> |
|--------------------|----------------------|----------|---------------|
|                    | <b>-</b>             | <b>+</b> |               |
| <b>Gen pozitif</b> | 3                    | 91       | 94            |
| <b>Gen negatif</b> | 1                    | 17       | 18            |
| <b>Toplam</b>      | 4                    | 108      | 112           |

Sulandırım adımı atlanarak yapılan testte OXA-48 üreticileri için duyarlılık % 96,7'ye yükselirken VIM ve NDM üreticilerinde bu değer % 100 olmuştur (Çizelge 4.9).

**Çizelge 4. 9.** Değişik karbapenemz genleri için modifiye Hodge testinin (0,5 McFarland) duyarlılık yüzdeleri

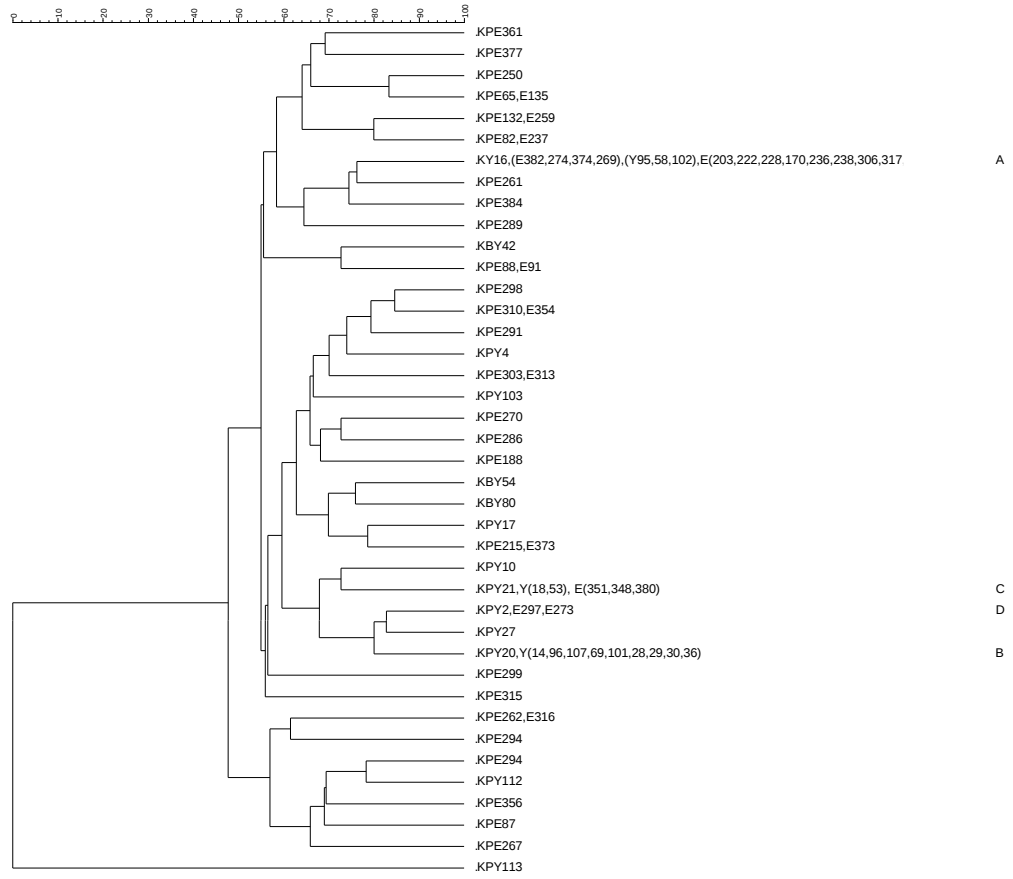
| <b>DUYARLILIK (%)</b> |      |
|-----------------------|------|
| <b>OXA-48</b>         | 96.7 |
| <b>VIM</b>            | 100  |
| <b>NDM</b>            | 100  |

#### **4.5. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) Sonuçları**

Elektroforez jel görüntüsünde her bir izolata ait bant profili GelCompar II (Applied Biosystems, Belçika) programı kullanılarak analiz edilmiştir. UPGMA (Unweighted pair group method with mathematical averaging) metodu ve Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak PFGE profillerinin dendogramları oluşturulmuş ve kümelenme analizi yapılmıştır. Değerlendirmede tolerans % 1 olarak alınmıştır. Bu istatistiksel analizde % 90-100 uyum gösteren isolatlar aynı; % 80-90 arası uyum gösterenler yakın ilişkili; % 70-80 arası uyum gösterenler muhtemel ilişkili olarak değerlendirilmiştir. % 70'in altı ise ilişkisiz kabul edilmiştir.

##### **4.5.1. *K.pneumoniae* İzolatları için PFGE Sonuçları**

Sonuçlar değerlendirildiğinde *K. pneumoniae* izolatlarının dört pulsotip altında (A-D) kümelendiği saptanmıştır. İzolatların 16 tanesi (% 14,3) pulsotip A, 10 tanesi (% 8,9) pulsotip B, 6 tanesi (% 5,4) pulsotip C ve 3 tanesi (% 2,7) de pulsotip D olarak kümelenme göstermiştir. Pulsotip B ile pulsotip D'deki isolatlar birbiriyle muhtemel ilişkili bulunmuştur. Diğer gruplar arasındaki benzerlik oranı % 70'in altında bulunmuştur (Şekil 4.20).



Şekil 4. 20. *K. pneumoniae* izolatlarına ait PFGE dendogramı

Farklı PFGE paternlerine sahip *K. pneumoniae* izolatlarının kliniklere göre dağılımı incelendiğinde pulsotip A ve pulsotip C izolatları herhangi bir klinikte istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmazken pulsotip B izolatları reanimasyon ünitesinde anlamlı oranda yüksek bulunmuştur ( $p=0,031$ ). Pulsotip B izolatlarının yoğun bakım ve yoğun bakım dışı bölümler arasındaki dağılımı incelendiğinde de yoğun bakım ünitelerinde anlamlı oranda yüksek saptandığı belirlenmiştir ( $p=0,002$ ) (Çizelge 4.10).

Çizelge 4. 10. Farklı pulsotiplerdeki *K.pneumoniae* izolatlarının kliniklere göre dağılımı

|                                  | <b>Pulsotip A</b> | <b>Pulsotip B</b> | <b>Pulsotip C</b> |
|----------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| <b>Cerrahi klinikler</b>         | 42 (% 43,8)       | 1 (% 10)          | 1 (% 16,7)        |
| <b>Cerrahi yoğun bakımlar</b>    | 10 (% 10,4)       | 3 (% 30)          | 0 (% 0)           |
| <b>Dahili klinikler</b>          | 16 (% 16,7)       | 0 (% 0)           | 1 8(% 16,7)       |
| <b>Dahili yoğun bakımlar</b>     | 5 (% 5,2)         | 0 (% 0)           | 0 (% 0)           |
| <b>Reanimasyon ünitesi</b>       | 23 (% 24)         | 6 (% 60)          | 4 (% 66,7)        |
| <i>p değeri</i>                  | 0,265             | 0,031             | 0,256             |
| <b>Yoğun bakım üniteleri</b>     | 10 (% 62,5)       | 9 (% 90)          | 4 (% 66,7)        |
| <b>Yoğun bakım dışı bölümler</b> | 6 (% 37,5)        | 1 (% 10)          | 2 (% 33,3)        |
| <i>p değeri</i>                  | 0,106             | 0,002             | 0,399             |

Farklı pulsotiplerdeki *K. pneumoniae* izolatlarının her bir antimikrobiyal için direnç yüzdeleri ve diğer izolatlarla direnç oranları karşılaştırıldığında hesaplanan p değerleri Çizelge 4.11’de izlenmektedir.

**Çizelge 4. 11.** Farklı pulsotiplerdeki *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik direnç profilleri

|             | Pulsotip A  | <i>p</i> değeri | Pulsotip B | <i>p</i> değeri | Pulsotip C              | <i>p</i> değeri |
|-------------|-------------|-----------------|------------|-----------------|-------------------------|-----------------|
| ETP direnci | 16 (% 100)  | 0,591           | 10 (% 100) | 1,000           | 6 (% 100)               | 1,000           |
| IMP direnci | 10 (% 62,5) | 0,253           | 10 (% 100) | 0,002           | 3 (% 50)                | 0,571           |
| MEM direnci | 13 (% 81,2) | 0,074           | 10 (% 100) | 0,064           | 5 (% 83,3)              | 0,830           |
| DOR direnci | 13 (% 81,2) | 0,091           | 10 (% 100) | 0,009           | 5 (% 83,3)              | 0,533           |
| SXT direnci | 13 (% 81,2) | 0,757           | 9 (% 90)   | 0,446           | 6 (% 100)               | 0,333           |
| FEP direnci | 12 (% 75)   | 0,669           | 10 (% 100) | 0,130           | 4 (% 66,7)              | 0,779           |
| LEV direnci | 14 (% 87,5) | 0,005           | 10 (% 100) | 0,031           | 2 (% 33,3) <sup>2</sup> | <0,001          |
| CIP direnci | 16 (% 100)  | 0,01            | 10 (% 100) | 0,091           | 6 (% 100)               | 0,306           |
| AK direnci  | 1 (% 6,2)   | 0,106           | 3 (% 30)   | 0,644           | 4 (% 66,7)              | 0,036           |
| TZP direnci | 16 (% 100)  | 0,659           | 9 (% 90)   | 0,480           | 6 (% 100)               | 1,000           |
| GN direnci  | 3 (% 18,8)  | 0,548           | 0 (% 0)    | 0,053           | 5 (% 83,3)              | 0,013           |
| FOX direnci | 10 (% 62,5) | 0,659           | 10 (% 100) | 0,003           | 3 (% 50)                | 1,000           |
| AMC direnci | 16 (% 100)  | 1,000           | 10 (% 100) | 1,000           | 6 (% 100)               | 1,000           |
| CTX direnci | 14 (% 87,5) | 0,317           | 10 (% 100) | 0,530           | 4 (% 66,7)              | 0,175           |
| CAZ direnci | 12 (% 75)   | 0,814           | 10 (% 100) | 0,074           | 4 (% 66,7)              | 1,000           |
| ATM direnci | 13 (% 81,2) | 0,463           | 10 (% 100) | 0,055           | 1 (% 16,7)              | 0,023           |
| CZ direnci  | 16 (% 100)  | <sup>1</sup>    | 10 (% 100) | <sup>1</sup>    | 6 (% 100)               | <sup>1</sup>    |

<sup>1</sup> CZ için izolatların tamamı %100 direnç gösterdiği için p değeri hesaplanmamıştır.

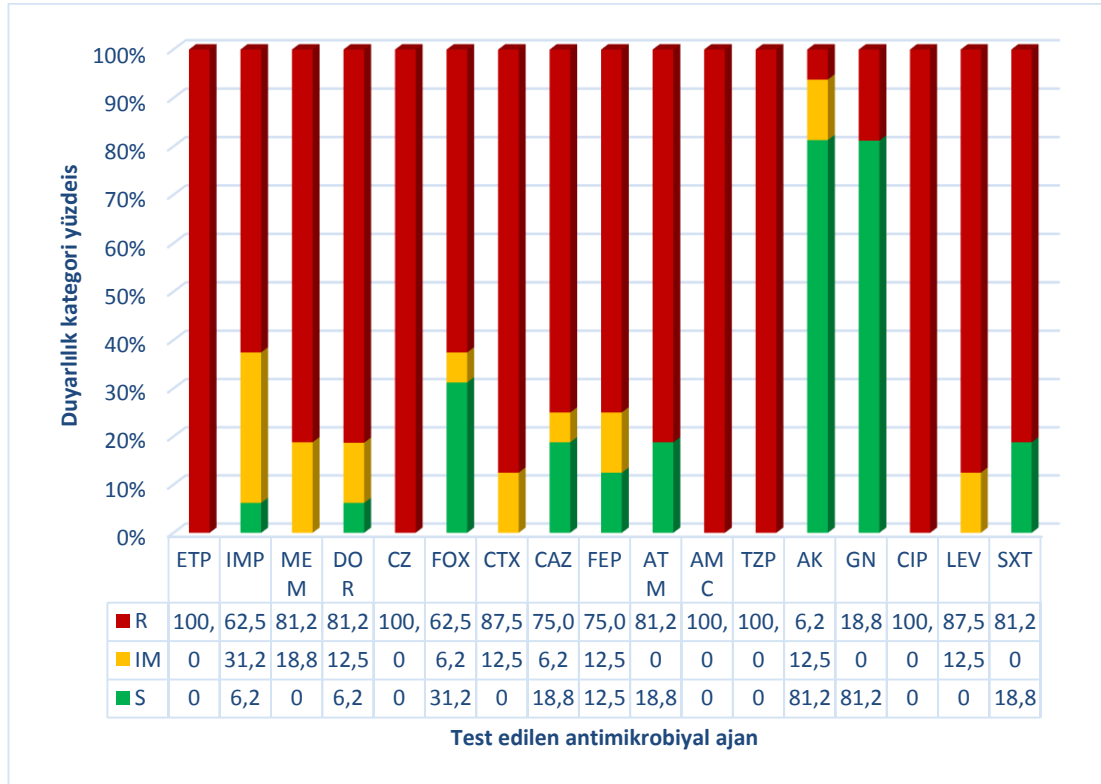
<sup>2</sup> LEV için duyarlılık oranı % 0 olarak bulunmuştur ve bu oran diğer izolatlara göre anlamlı derecede düşüktür.

Pulsotip A’da yer alan 16 izolat incelendiğinde; bu suşların izole edildiği hastaların 12’sinin kadın, dört tanesinin ise erkek olduğu gözlenmiştir. 10 tanesi yoğun bakımlardan, altı tanesi yoğun bakım dışı bölümlerden izole edilen pulsotip A izolatların en sık tespit edildiği yer, reanimasyon ünitesi olmuştur (n=6). En sık izole edilen örnekler kan (% 50) ve solunum yolu örnekleri (% 25) olmuştur.

Pulsotip A’da yer alan 16 izolatın 13’ünde OXA-48 pozitifliği görülürken hiçbirinde VIM ya da NDM pozitifliğine rastlanmamıştır.

Pulsotip A’daki izolatların antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde; ertapeneme % 100; imipeneme % 62,5; meropenem ve doripeneme % 81,2; sefazoline % 100; sefoksitine % 62,5; sefotaksime % 87,5; seftazidim ve sefepime % 75; aztreonama % 81,2; amikasin % 6,2; gentamisine % 18,8; levofloksasine % 87,5 ve trimetoprim-sulfametoksazole % 81,2 oranında direnç gözlenmiştir. Ertapenem, sefazolin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktam ve siprofloksasine ise tüm izolatlarda direnç gözlenmiştir (Şekil 4.21).

Pulsotip A izolatlarında, tüm izolatlarla karşılaştırıldığında kinolonlara direnç oranı anlamlı derecede yüksek bulunurken, diğer antibiyotiklere direnç oranlarında anlamlı fark bulunmamıştır (Siprofloksasin için  $p=0,01$  ve levofloksasin için  $p=0,005$ ) (Tablo 4.5) (Çizelge 4.11).



Şekil 4. 21. Pulsotip A’da yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları

Gradyent difüzyon test ile bakılan karbapenem MİK değerleri değerlendirildiğinde; 16 izolatın tamamında ertapenem için 2 µg/mL ve üzerinde sonuç elde edilmiştir. Meropenem için bakıldığında; izolatların 10 tanesi (% 62,5) 4 µg/mL ve üzerinde MİK değerine sahipken dört tane izolatta 1 µg/mL ve altında, iki tane izolatta ise 1-4 µg/mL arasında MİK değerleri bulunmuştur.

A pulstotipindeki izolatların yıllara göre dağılımı incelendiğinde 2011 yılından itibaren her yıl bu profile sahip *K. pneumoniae* izolatı saptanmıştır. Bu sayı 2011 için üç, 2012 için yedi, 2013 için üç ve 2014 için üç olmuştur.

Pulsotip A'daki izolatların izole edildikleri bölümler ve izolasyon tarihleri, antibiyotik direnç profilleri, MİK değerleri ve karbapenemaz geni pozitif veya negatif olma gibi özellikleri itibariyle birbirinden farklı olduğu saptanmıştır. 2012 yılında görülen kümelenme kendi içerisinde değerlendirildiğinde de benzer kriterler göz önüne alınarak izolatların birbiriyle benzerlik göstermediği gözlenmiştir.

Pulsotip B, tüm izolatların % 8,9'unu oluşturmaktadır (n=10). Bu pulstotipe sahip suşların izole edildiği hastaların yedi tanesinin kadın, üç tanesinin erkek olduğu gözlenmiştir. Pulsotip B'de yer alan izolatlar, bir tanesi hariç yoğun bakımlardan izole edilmiş olup yoğun bakımlardaki bu kümelenme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,002). Yoğun bakımlar arasında da çoğunluğu reanimasyon ünitesinden gelen örnekler oluşturmaktadır (p=0,031) (Çizelge 4.10). Örneklerin laboratuvara kabul tarihleri incelendiğinde ise tamamının 2013 yılı sonu ve 2014 yılı ilk yarısında gönderildiği belirlenmiştir.

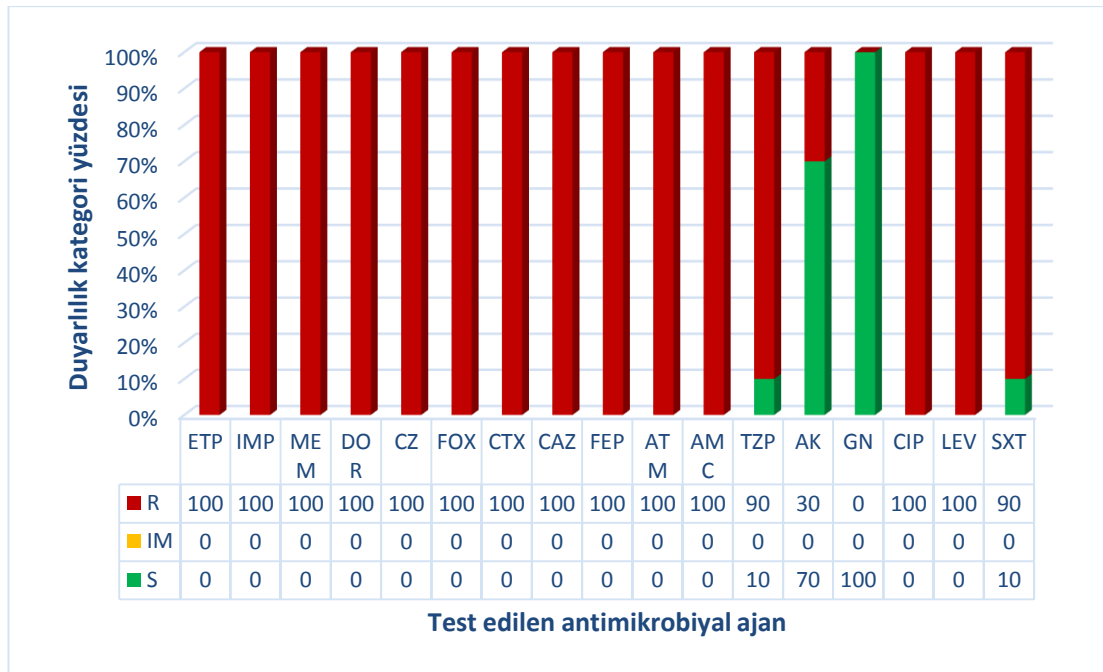
Pulsotip B'de yer alan 10 izolatın tamamında OXA-48 pozitifliği görülürken izolatların hiçbirinde VIM ya da NDM pozitifliğine rastlanmamıştır.

Pulsotip B'deki izolatlarda GSBL varlığı iki tane izolatta fenotipik yöntemlerle doğrulanmıştır.

Pulsotip B'de yer alan izolatların antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde ertapenem, imipenen, meropenem, doripenem, sefazolin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefepim, aztreonam, amoksisilin-klavulanik asit, siprofloksasin ve levofloksasin için direnç oranı % 100 bulunurken piperasilin-tazobaktam ve

trimetoprim-sulfametoksazol için bu oran % 90 bulunmuştur. İzolatların çoğunluğu (% 70) amikasin duyarlılık gösterirken gentamisin direnç hiçbir izolatta gözlenmemiştir (Şekil 4.22).

Pulsotip B izolatlar, tüm izolatlarla karşılaştırıldığında imipenem, doripenem, levofloksasin ve sefoksitin için anlamlı oranda dirençli bulunmuştur (İmipenem için  $p=0,002$ ; doripenem için  $p=0,009$ ; levofloksasin için  $p=0,031$ ; sefoksitin için  $p=0,003$ ). Meropenem, aztreonam ve seftazidim için direnç oranları da yüksek bulunmuştur. Bu antimikrobiyaller için istatistiksel olarak anlamlılık sınırının üzerinde olmakla birlikte sınır değere yakın sonuçlar elde edilmiştir (Meropenem için  $p=0,064$ ; aztreonam için  $p=0,055$  ve seftazidim için  $p=0,074$ ). Gentamisin duyarlılık oranı da yüksek bulunmasına rağmen benzer şekilde  $p$  değeri istatistiksel anlamlılık için belirlenen değere yakın fakat üzerinde bulunmuştur (Gentamisin için  $p=0,053$ ) (Çizelge 4.11).



Şekil 4. 22. Pulsotip B’de yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları

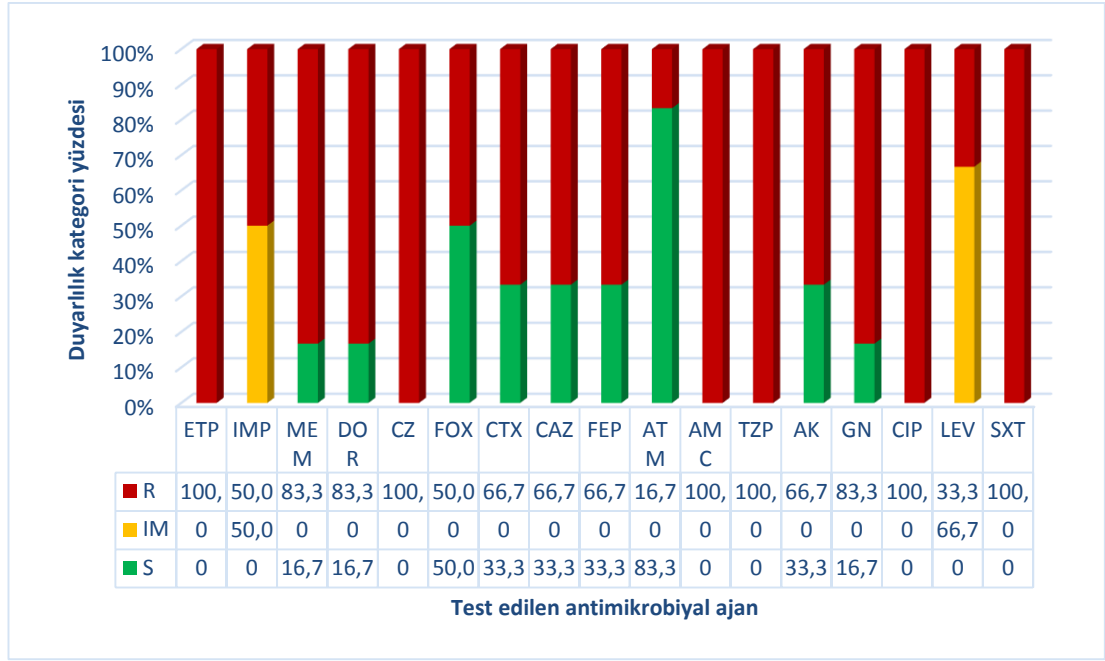
Gradyent difüzyon test ile bakılan MİK değerleri değerlendirildiğinde izolatların tamamında ertapenem için 8 µg/mL’nin üzerinde, meropenem için de 24 µg/mL’nin üzerinde MİK değerleri bulunmuştur.

İzolasyon zamanları ve yerlerindeki ve fenotipik-genotipik özelliklerindeki yüksek benzerlikler, İbni Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde pulsotip B'deki izolatların neden olduğu muhtemel bir salgın olarak düşünülmüştür.

Pulsotip C, altı tane izolatta belirlenmiştir. Bu suşların izole edildiği hastaların beş tanesi kadın, bir tanesi erkektir. Pulsotip C'de yer alan izolatlar ağırlıklı olarak reanimasyon ünitesinde kümelenme göstermiştir ( $p=0,009$ ). Örneklerin laboratuvara kabul tarihleri incelendiğinde ise beş tanesinin 2013 yılı mart ayından itibaren ve bir tanesinin 2014 yılı ocak ayında gönderildiği belirlenmiştir. Örneklerin üçü idrar örneği iken birer tane kan, abse ve trakeal aspirat örneğinden pulsotip C suşları izole edilmiştir.

İzolatların tamamında OXA-48 geni pozitif bulunmuştur. Bir tane izolatta OXA-48 genine ilaveten VIM geni de saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde NDM pozitifliği saptanmamıştır.

Pulsotip C'de yer alan izolatların antibiyotik duyarlılıkları incelendiğinde ertapenem, sefazolin, amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktam, siprofloksasin ve trimetoprim-sulfametoksazol için direnç oranı % 100 bulunurken meropenem ve doripenem için bu oran % 83,3; sefoksitin için % 50; sefotaksim, seftazidim, sefepim için % 66,7 bulunmuştur. İmipenem izolatların % 50'si dirençli iken kalanları orta duyarlıdır. İzolatlarda aminoglikozit direnci yüksek oranda görülmüştür. Bu oran gentamisin için % 83,3 ( $p=0,013$ ); amikasin için % 66,7 ( $p=0,036$ ) olarak bulunmuştur. Levofloksasine izolatların % 66,7'si orta duyarlı ve % 33,3'ü dirençli bulunurken hiç duyarlı izolat bulunmamıştır ve levofloksasin duyarlılık yüzdesi diğer izolatlara göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p<0,001$ ). Aztreonamda ise diğer izolatların tersine duyarlılık oranı oldukça yüksek olarak tespit edilirken (% 83,3); bu oran istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ( $p=0,023$ ) (Şekil 4.23 ve Çizelge 4.11).



**Şekil 4. 23.** Pulsotip C’de yer alan izolatların Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçları

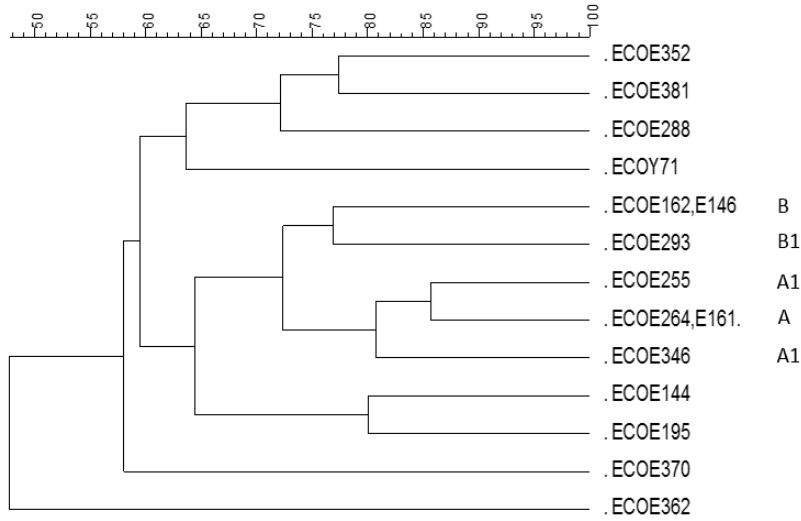
Gradyent difüzyon test ile bakılan MİK değerleri değerlendirildiğinde izolatların tamamında ertapenem için 2 µg/mL ve üzerinde MİK sonuçları elde edilmişken meropenem için bu değerler üç tanesinde 1 µg/mL’nin altında, bir tanesinde 1-4 µg/mL arasında ve iki tanesinde ise 4µg/mL’nin üzerinde bulunmuştur.

Pulsotip D’deki izolatlar pulsotip B’dekilerle, PFGE paternleri bakımından muhtemel ilişkili bulunmuştur fakat antibiyotik direnç profilleri ve MİK değerleri bakımından benzerlik bulunmamıştır. Fakat pulsotip D’deki izolatlar da yoğun bakımlardan gönderilmiştir ve dolayısıyla izolasyon yerleri açısından pulsotip B’dekiler ile benzerlik göstermiştir.

#### 4.5.2. *E. coli* İzolatları için PFGE Sonuçları

Çalışmada incelenen 15 *E. coli* izolatının PFGE sonuçları değerlendirildiğinde iki pulsotip altında (A ve B) kümelenmediği saptanmıştır.

Pulsotip A iki izolattan oluşuyorken iki izolat da (A1) bunlarla yakın ilişkili bulunmuştur. Pulsotip B’de de iki izolat bulunuyorken bir tane izolat (B1) bununla yakın ilişkili bulunmuştur. Pulsotip A ve B’deki izolatlar, birbiriyle muhtemel ilişkili bulunmuştur. Bu altı izolatin dışındakiler tekli ya da en fazla birbiriyle ilişkili ikili izolatlar olacak şekilde PFGE profili göstermişlerdir (Şekil 4. 24).



Şekil 4. 24. *E. coli* izolatlarına ait PFGE dendogramı

Pulsotip A’daki iki izolattan biri reanimasyon ünitesinden, diğeri üroloji bölümünden gönderilmiştir. Bunlarla yakın ilişkili izolatlardan (A1) biri yine reanimasyon ünitesinden, diğeri ise genel cerrahi yoğun bakım ünitesinden gönderilmiştir. Pulsotip A’daki izolatların ikisi de OXA-48 pozitif bulunmuştur. Pulsotip A1’deki izolatlardan biri OXA-48 üreticisiyken diğerinde herhangi bir karbapenemaz geni saptanmamıştır.

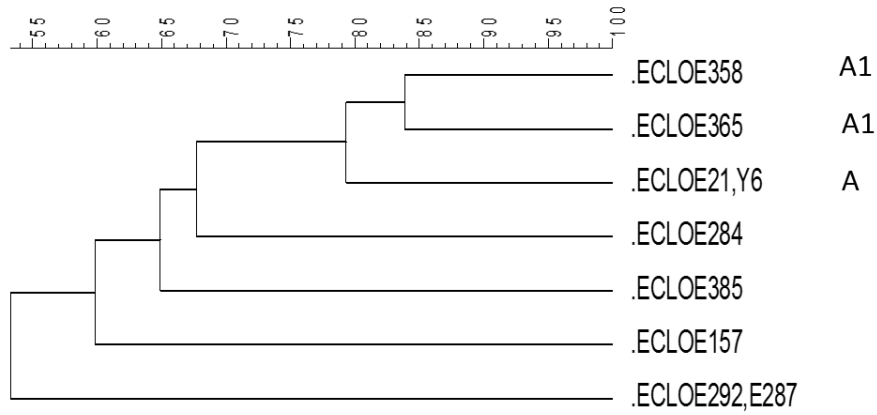
Reanimasyon ünitesinden gönderilen iki örneğin (biri pulsotip A, diğeri pulsotip A1) antibiyotik direnç profilleri ve taşıdıkları karbapenemaz genleri bakımından diğer iki izolata göre daha çok benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Pulsotip B’deki izolatların ikisi reanimasyon ünitesinden, diğeri gastroenteroloji bölümünden gönderilmiştir. Üç izolat da OXA-48 geni açısından pozitif bulunmuştur ve antibiyotik direnç profilleri birbirine benzemektedir.

Pulsotip A ve B'deki izolatlar arasında da antibiyotik direnç profilleri açısından büyük ölçüde uyumluluk söz konusudur.

#### 4.5.3. *E. cloacae* İzolatları için PFGE Sonuçları

Çalışmada incelenen 10 tane *E. cloacae* izolatının PFGE sonuçları değerlendirildiğinde iki izolat pulsotip A ve bununla muhtemel ilişkili iki izolat pulsotip A1 olarak isimlendirilmiştir. Kalan izolatlar tekli ya da en fazla ikili izolatlardan oluşan pulsotipler halinde dağılım göstermiştir (Şekil 4.25).



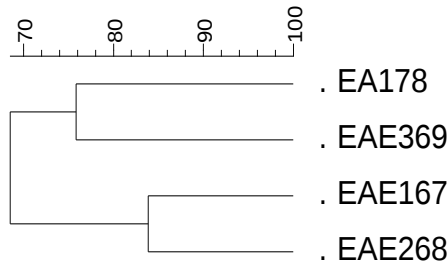
Şekil 4. 25. *E. cloacae* izolatlarına ait PFGE dendogramı

Pulsotip A'daki iki izolat beyin cerrahisi bölümünden gönderilen kan kültürlerinden izole edilmişken diğer iki izolatın biri yine beyin cerrahisinden gönderilen kan kültüründen, diğeri ise ortopedi bölümünden gönderilen bir yara örneğinden izole edilmiştir.

Pulsotip A'daki iki izolat, OXA-48 pozitiflikleri ve antibiyotik direnç profilleri bakımından birbiriyle benzer bulunurken diğer iki izolattan farklılık göstermişlerdir.

#### 4.5.4. *E. aerogenes* İzolatları için PFGE Sonuçları

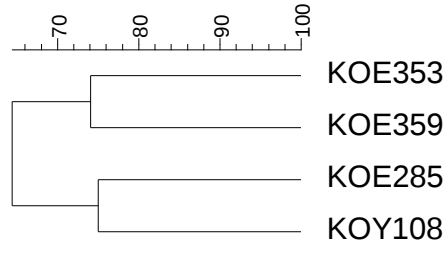
Çalışmada incelenen dört tane *E. aerogenes* izolatının PFGE sonuçları değerlendirildiğinde iki izolat birbiriyle ilişkili bulunmuştur. Diğer iki izolat ise birbiriyle muhtemel ilişkili bulunmuştur (Şekil 4.26). İzolatlar, elde edildikleri yıl ve bölüm, antibiyotik direnç profilleri, karbapenem MİK değerleri ve taşıdıkları karbapenemaz genleri bakımından birbiriyle ilişkisiz olarak yorumlanmıştır.



Şekil 4. 26. *E. aerogenes* izolatlarına ait PFGE dendogramı

#### 4.5.4. *K. oxytoca* İzolatları için PFGE Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen *K. oxytoca* suşları, PFGE paternleri bakımından birbiriyle muhtemel ilişkili ikişer izolat olarak görülmüştür (Şekil 4.27). İzolatların tamamı OXA-48 geni bakımından pozitif bulunmuştur. Gönderildikleri bölümlere bakıldığında acil, iç hastalıkları yoğun bakım, romatoloji ve ortopedi olmak üzere her izolatın farklı bir bölümden gönderildiği belirlenmiştir. Acil ve iç hastalıkları yoğun bakımdan gönderilen ve birbiriyle muhtemel ilişkili bulunan iki izolatın antibiyotik direnç profilleri birbirine benzemezken romatoloji ve ortopedi bölümlerinden gönderilen izolatların antibiyotik direnç profilleri birbiriyle benzer bulunmuştur.



**Şekil 4. 27.** *K. oxytoca* izolatlarına ait PFGE dendogramı

## 5. TARTIŞMA

2000’li yıllardan önce *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnci göz ardı edilen bir fenomen olmuştur ve karbapenemlere azalmış duyarlılık çoğunlukla GSBL ya da AmpC üretiminin beraberinde dış membran porinlerinde kayıp varlığıyla açıklanmıştır. IMP ve VIM tipi metallo- $\beta$ -laktamazların üretimine bağlı karbapenem direnci artan sayılarda bildirilmiş olsa da karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* prevalansı oldukça düşük olmuştur (Rasmussen ve Bush, 1997). Bu tablo 1990’ların sonunda ortaya çıkan ve 2000’li yıllarda süratle dünya genelinde yayılım gösteren KPC üreticisi *K. pneumoniae* izolatları, OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri ve NDM üreticileri ile değişmiş ve artık günümüzde çoğu ülkede karbapenemaz üreten mikroorganizmalar rutin olarak tespit edilir hale gelmiştir (Doi ve ark., 2015).

Karbapenemaz genleri çoğunlukla başka direnç genlerini de üzerinde barındıran ve kendi kendini konjuge edebilen plazmitler aracılığıyla yüksek aktarım oranına sahiptir. Dolayısıyla karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatları  $\beta$ -laktamların yanı sıra çoğunlukla florokinolonlar, aminoglikozitler, trimetoprim-sulfametoksazol gibi farklı sınıf antibiyotiklere de direnç göstermektedir (Nordmann ve Poirel, 2013). Karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* izolatları ile ilişkili enfeksiyonların mortalite oranları da yüksek olmaktadır (Souli ve ark., 2010). Hem doğru tedavi şemaları belirleyebilmek, hem de hastanede oluşabilecek bir salgın durumundan kaçınabilmek için karbapenemaz üreticilerinin hızlı ve doğru şekilde saptanmasına ciddi ihtiyaç vardır (Nordmann ve Poirel, 2013).

CLSI (2015) kılavuzuna göre karbapenem üreten *Enterobacteriaceae* izolatları çoğunlukla bir ya da daha fazla karbapenem grubu antimikrobiyale orta duyarlılık veya direnç göstermektedir ve üçüncü kuşak sefalosporinlerden (sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, seftriakson gibi) bir ya da daha fazlasına direnç göstermektedir. Kılavuzda ertapeneme duyarlılıkta kayıp, karbapenemaz üretimi için en duyarlı belirteç olarak ifade edilmiştir. Bu özelliklerdeki izolatlarda sadece

epidemiyolojik araştırma ya da enfeksiyon kontrol amaçlarıyla karbapenemaz doğrulanması önerilmektedir.

Çalışmamızda karbapenemaz varlığı ve tipleri açısından incelenecek izolatlar belirlenirken CLSI'nın (2015) önerileri doğrultusunda izolatların ertapenem orta duyarlılık ya da direnç göstermesi kriter olarak kullanılmıştır. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerde izole edilen ve Kirby-Bauer disk difüzyon yönteminde ertapenem etrafındaki inhibisyon zon çapı 22 mm'nin altında ölçülen 112 izolat çalışmamıza dahil edilmiştir.

Hangi izolatlarda karbapenemaz üretimi açısından doğrulama yapılacağına dair yaklaşım, EUCAST (2015) kılavuzunda CLSI (2015) önerilerinden farklıdır. Klinik sınır değerlere göre duyarlı bulunan fakat aslında karbapenemaz geni taşıyan izolatlara, özellikle de OXA-48/OXA-181 üreticileri arasında rastlanabilmektedir (Nordmann ve ark., 2012b). Bu tip izolatları atlamamak için EUCAST (2015), ayrıca epidemiyolojik sınır değerleri belirlemiştir. Karbapenemaz taramasında hangi karbapenem grubu antibiyotiğin kullanılacağı konusunda da EUCAST (2015) kılavuzu CLSI'dan (2015) ayrılmakta ve ertapenem kullanımı önerilmemektedir. Her ne kadar ertapenemin karbapenemaz saptamada duyarlılığı yüksek ise de spesifitesinin düşük olduğu ifade edilmektedir. Özellikle de *Enterobacter spp.* gibi türlerde GSBL veya AmpC üretiminin yanı sıra porin kaybı olan izolatlarda ertapenemin stabilitesi görece düşüktür (Nordmann ve ark., 2012b). Kılavuzda ertapenem yerine, duyarlılık-özgüllük dengesi en iyi bulunan meropenemin kullanımı önerilmektedir. Meropenem için Kirby-Bauer disk difüzyon testinde inhibisyon zon çapı 25 mm'nin altında ölçülen izolatların karbapenemazlar açısından doğrulanması, hatta OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu ülkelerde bu değer 27 mm olarak alınması önerilmektedir. Çünkü bazı OXA-48 üreticilerinde inhibisyon zon çapının 26 mm'ye kadar çıktığı bildirilmiştir (EUCAST web sayfası, erişim adresi: [www.eucast.org/resistance\_mechanisms], erişim tarihi: 15/06/2015).

Ülkemizde de OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu göz önüne alınırsa EUCAST'in (2015) önerdiği tarama sınır değerlerinin kullanımı, karbapenemaz üreticilerini atlamamak için daha yararlı gözükmemektedir. Fakat çalışmanın yapıldığı

zaman diliminde İbni Sina Hastanesi Merkez Bakteriyoloji Laboratuvarı'nda CLSI kılavuzundaki kriterler doğrultusunda değerlendirme yapıldığından ve karbapenemaz taramasına yönelik epidemiyolojik sınır değeri kullanılmadığından, CLSI'nın (2015) önerdiği şekliyle ertapenem orta duyarlı ya da dirençli bulunan izolatlar incelemeye alınmıştır.

Hem CLSI (2015), hem de EUCAST (2015) kılavuzları karbapenemaz üretiminin doğrulanmasını rutin olarak önermemekte ve sadece epidemiyolojik araştırmalarda ya da enfeksiyon kontrolünde yararlı görmekte ise de bazı araştırmacılar kılavuzlarda bildirilen bu duruma katılmamaktadır (Livermore ve ark., 2012; Nordmann ve Poirel, 2013). Çünkü karbapenemlere in vitro duyarlı bulunmalarına rağmen bazı karbapenemaz üreticilerinin karbapenem içeren rejimlerle tedavisinde problem yaşanabilmektedir (Mimos ve ark., 2012). Dolayısıyla karbapenemaz üreticilerini taramada kullanılacak sınır değerler önem arz etmektedir.

Karbapenemaz üreticilerinin belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesinde moleküler yöntemler altın standart olmaya devam etmektedir. Çoğu PZR tabanlı olan bu yöntemleri, herhangi bir karbapenemaz varyantının kesin olarak tanımlanması isteniyorsa (KPC-2, NDM-1, VIM-5 gibi), dizi analizi takip edebilir. Tekli PZR teknikleri uygulanabileceği gibi multipleks ya da gerçek zamanlı PZR uygulamaları da yapılabilmektedir. Yayınlanan primerler ve standardize döngü koşulları ile klinik olarak yaygın karbapenemaz genleri kolay şekilde saptanabilmektedir (Nordmann ve Poirel, 2013).

Çalışmamızda da karbapenemaz genlerinin saptanmasında multipleks PZR yöntemi uygulanmıştır. 112 izolattan 94 tanesinde en az bir karbapenemaz genine rastlanırken kalan 18 izolatta karbapenemaz genleri açısından negatif sonuç alınmıştır. İzolatlarda araştırılan 11 karbapenemaz geni içinde OXA-48, VIM ve NDM geni pozitifliklerine rastlanırken KPC, IMP, SPM, BIC, AIM, DIM, GIM ve SIM gen pozitifliğine rastlanılmamıştır.

OXA-48, sınıf D  $\beta$ -laktamazlar arasında yer alan, plazmitle aktarım gösteren, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi inhibitörlere direnç gösteren karbapenemazlardır (Nordmann ve Poirel, 2013). İlk olarak 2001 yılında ülkemizde

saptanan bu gen, 54 yaşındaki bir erkek hastanın idrar yolu örneğinden tanımlanmıştır (Poirel ve ark., 2004). Carrër ve arkadaşları (2008) İstanbul’da 2006 Mayıs-2007 Ocak tarihleri arasında ortaya çıkan ve OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatlarının neden olduğu bir salgın raporlamıştır. OXA-48 geni pozitif bulunan ilk *E. coli* ve *C. freundii* izolatları da ülkemizden bildirilmiştir (Nazic ve ark., 2005; Gülmez ve ark., 2008). Aktaş ve arkadaşlarının (2008) yaptıkları çalışmada OXA-48 üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarının İstanbul’da görülmeye devam ettiği bildirilmiştir. Uzun bir dönem boyunca OXA-48 bildirimleri sadece Türkiye’den yapılmışken artık pek çok Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkesinde OXA-48 pozitif izolatlar sıklıkla saptanmaktadır (Poirel ve ark., 2012a).

Yapılan araştırmalar OXA-48 üreticilerinin ülkemizde yaygın olarak görülmeye devam ettiğini göstermektedir (Alp ve ark., 2013; Azap ve ark., 2013; Demir ve ark., 2015 ve Kılıç ve ark., 2011).

Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hastanesinde gerçekleştirilen bir çalışmada, 2008 yılı Nisan ve Aralık ayları arasında izole edilen 515 klinik *Enterobacteriaceae* izolatı arasında dört tane karbapenem dirençli bakteri (üç tanesi *K. pneumoniae* ve bir tanesi *E. coli*) izole edilmiştir. PZR ve dizi analizleri sonucu izolatların tamamında OXA-48 geni varlığı gösterilmiştir (Kılıç ve ark., 2011).

Azap ve arkadaşlarının (2013) Başkent Üniversitesi Hastanesinde yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitelerinden izole edilen 16 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatı incelenmiş ve hepsinde OXA-48 pozitifliği görülürken KPC, IMP, VIM, NDM ve GES tipi karbapenemazların varlığına rastlanmamıştır.

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 137 hastadan izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’lerin dahil edildiği bir çalışmada izolatların 94 tanesinde karbapenemaz genlerine rastlanmış ve bunların % 91,5’i tek başına OXA-48 üreten izolatlar olmuştur (Alp ve ark., 2013).

Karbapenemaz genlerinin HyplexSuperBug ID kiti ile araştırıldığı bir çalışmada ise 57 izolat karbapenemaz üreticisi bulunmuştur. Bunların 49 tanesinde (% 86) OXA-48 geni pozitif olarak belirlenmiştir (Demir ve ark., 2015).

Çalışmamızda da en sık olarak OXA-48 geni saptanmıştır. Bakteriyel izolatların 83 tanesinde (% 74,1) tek başına, yedi tanesinde (% 6,3) ise VIM geni ile birlikte olmak üzere izolatların % 80,4'ünde OXA-48 pozitifliği tespit edilmiştir.

OXA-48 üreticilerinin % 71'ini *K. pneumoniae* türü bakteriler oluşturmakta iken % 16'sı *E. coli*, % 7'si *E. cloacae*, % 4'ü *K. oxytoca* ve % 2'si *E. aerogenes* türlerine ait bulunmuştur.

Fransa'da yapılan karbapenemaz epidemiyolojisine yönelik bir çalışmada 1485 izolat test edilmiş ve 341 tanesi (% 22,9) karbapenemaz pozitif bulunmuştur. Bunların arasında en sık görüleni % 75,4'lük bir oranla OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticileri olmuştur. Bunların nozokomiyal geçişi net belirlenememiş olup toplum kökenli yayılımın muhtemel olabileceği de ifade edilmiştir. OXA-48 benzeri karbapenemazların *Enterobacteriaceae* üyeleri arasındaki dağılımı da incelenmiş ve karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının % 76,8'inde; *E. coli* izolatlarının % 81,1'inde; *Enterobacter* türlerinin % 75,8'inde ve diğer enterobakteriyel türlerin % 53,3'ünde pozitiflik saptanmıştır. OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinin türler arasındaki dağılımında anlamlı fark bulunmamıştır (Dortet ve ark., 2014b).

Çalışmamızda da incelenen her bir *Enterobacteriaceae* türünde OXA-48 pozitifliği en sık görülen karbapenemaz tipi olmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarının % 76'sında tek başına, % 5'inde VIM geni ile birlikte olmak üzere bu oran % 81 olmuştur. Aynı oran *E. coli* izolatlarında % 93,3 iken *Enterobacter* türlerinde % 57,1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen dört tane *K. oxytoca* izolatının tamamında OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. OXA-48 tipi karbapenemazların türler arasındaki dağılımında ise anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p=0,117$ ).

*K. oxytoca* türlerinde OXA-48 pozitifliği Nazik ve arkadaşları (2014) tarafından da bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada OXA-48 pozitifliği saptadıkları beş tane *K. oxytoca* izolatında karbapenemaz genlerinin yanı sıra farklı tiplerde GSBL genlerinin de pozitif olduğu bildirilmiştir.

Çalışmamızda OXA-48 üreticilerinin kliniklere göre dağılımı incelendiğinde en sık olarak reanimasyon ünitesinden (% 27) izole edildiği görülmüştür.

OXA-48 pozitifliği herhangi bir bölümde anlamlı düzeyde yüksek bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). Yoğun bakım ve yoğun bakım dışı bölümler arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ).

İlk olarak 1997 yılında Verona’da (İtalya) bir *P. aeruginosa* suşunda tanımlanan VIM geni (Lauretti ve ark., 1999) daha sonra *Enterobacteriaceae*’ye, özellikle de *K. pneumoniae* türüne yayılım göstermiştir. VIM karbapenemaz üreticisi *K. pneumoniae* izolatları, KPC üreticileri kadar olmasa da dünya genelinde giderek artan sayıda raporlanmaktadır (Livermore, 2012). Bir yayında 2005 yılında Yunanistan’da kan dolaşımından izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarında % 40’a varan oranlarda VIM pozitifliği bildirilmiştir (Vatopoulos, 2008).

Pek çok farklı varyantı olmakla birlikte en yaygın olanı, plazmitlerden ziyade genellikle kromozom üzerinde lokalize olan VIM-2 genidir (Walsh, 2010).

Lokal salgınlar şeklinde karşımıza çıkabilmekle birlikte daha önemli konu, VIM geninin IncN plazmitleri aracılığıyla *K. pneumoniae* suşları arasında yaygınlaşması tehlikesidir (Garcia-Fernandez ve ark., 2011 ve Vatopoulos, 2008).

İtalya’da 2008 yılında VIM-1 üreten *K. pneumoniae* izolatlarının sorumlu olduğu kan dolaşımı enfeksiyonu salgınında, karbapenemaz direncinden sorumlu genin küçük bir plazmit aracılığıyla aktarılabilirdiği gösterilmiştir (Cagnacci ve ark., 2008).

Türkiye’de ise ilk defa 2007 yılında çoklu ilaç dirençli ve CTX-M-15 pozitif bir *K. pneumoniae* klinik izolatında VIM-1 metallo- $\beta$ -laktamaz geni saptanmıştır (Yıldırım ve ark., 2007).

Yunanistan’da artan sayılarda panrezistan (kolistin ve tigesiklin dahil) VIM-1 üreticisi *K. pneumoniae* izolatları bildirilmiştir (Miriagou ve ark., 2005).

Demir ve arkadaşları (2015) çalışmalarında karbapenemaz geni bulunduran 57 izolatın 2 tanesinde VIM pozitifliği bildirmişlerdir.

Dortet ve arkadaşlarının (2014b) yayınladığı epidemiyolojik çalışmada VIM geni pozitiflik oranı % 4,7 olarak belirlenmiştir. Karbapenemaz geni pozitif bulunan

225 *Klebsiella* izolatının 5 tanesinde, 33 *Enterobacter* izolatının 1 tanesinde, 24 *Citrobacter* izolatının ise 10 tanesinde VIM geni saptanmıştır. *Citrobacter* izolatlarındaki yüksek VIM geni pozitifliği, hastane içinde VIM pozitif bir izolatın klonal yayılımı ile açıklanmıştır.

Çalışmamızda karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta VIM geninin varlığı saptanmış olup toplam dokuz bakteride (% 8) pozitif olarak bulunmuştur. Bunlardan yedi tanesinde aynı zamanda OXA-48 geni de pozitif bulunmuştur. Diğer iki tanesinde ise sadece VIM geni pozitif olarak belirlenmiştir.

VIM üreticilerinin beş tanesini (% 55,6) *K. pneumoniae* türü bakteriler oluşturmakta iken iki *E. coli* izolatında (% 22,2) ve iki *E. cloacae* izolatında (% 22,2) VIM pozitifliği saptanmıştır. *E. aerogenes* ve *K. oxytoca* izolatlarında VIM pozitifliğine rastlanmamıştır.

NDM-1 en yeni keşfedilen, aktarılabılır özellikte olan, moleküler Sınıf B  $\beta$ -laktamazdır. İlk defa 2009 yılında İsviçre'deki bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında tanımlanmıştır (Yong ve ark., 2009).

Kumarasamy ve arkadaşlarının (2010) Hindistan, Pakistan ve İngiltere'de yaptıkları geniş bir epidemiyolojik çalışmada güney Hindistan'daki bir merkezde (Chennai) 44 adet, kuzey Hindistan'daki bir merkezde (Haryana) 26 adet, İngiltere'den 37 adet ve Hindistan ile Pakistan'ın diğer bölgelerinden 73 adet NDM-1 üreticisi izole edilmiştir. Kolistin ve tigesiklin hariç tüm antibiyotiklere yüksek direnç gösteren bu izolatlarda NDM-1 geninin çoğunlukla plazmitler üzerinde taşındığı ve Haryana'dan izole edilenlerin konjugatif olmadığı halde İngiltere'deki ve Chennai'dekilerin transfer edilebilir oldukları saptanmıştır. İngiltere'deki vakaların çoğunda Hindistan ya da Pakistan'a seyahat hikayesi veya bu ülkelerle bağlantı olduğu ifade edilmiştir.

Varanasi'de (Kuzey Hindistan) 2010 yılı Şubat ve Temmuz ayları arasında hastanede yatan ve polikliniğe başvuran hastalardan izole edilen 780 enterobakteriyel izolatta % 6,9 oranında NDM-1 prevelansı bildirilmiştir (Seema ve ark., 2011).

Mumbai'deki büyük bir hastanede izole edilen *Enterobacteriaceae* izolatları ile yapılan bir çalışmada da benzer veriler elde edilmiş ve örnek tipine göre % 5-8 arasında değişen NDM-1 geni prevalansı bildirilmiştir (Desphande ve ark., 2010a ve Desphande ve ark., 2010b).

Pakistan Rawalpindi'de yapılan bir çalışmada ise hastanede yatan ve polikliniğe başvuran hastaların barsak floralarında % 18,5 oranında NDM-1 taşıyıcılığı saptanmıştır (Perry ve ark., 2011).

2010 Ağustos ortalarından itibaren Orta ve Güney Amerika hariç dünya genelinde NDM-1 pozitif bakteriler bildirilmiştir (Nordmann ve ark., 2011b).

Ülkemizde uzun bir süre NDM bildirimi yapılmamış olup ilk kez 2011 Ekim ayında İstanbul yakınlarındaki bir hastanenin hematoloji ünitesine kabul edilen 16 yaşındaki bir erkek hastadan izole edilen *K. pneumoniae* izolatında NDM pozitifliği belirlenmiştir. Lösemili hasta, Bağdat'taki (Irak) bir hastaneden transfer edilmiş ve kabulünün ertesi günü allojenik hematopoietik kök hücre nakli yapılmıştır. İki hafta sonra, ciddi solunum yetmezliği ve ateş gelişmesinin ardından yoğun bakıma transfer edilen hastanın kan kültürlerinde biri *K. pneumoniae* ve diğeri de *E. coli* olmak üzere iki tane çoklu ilaç dirençli enterobakterial izolat tespit edilmiş ve *K. pneumoniae* izolatında NDM-1 ve CTX-M genlerinin varlığı gösterilmiştir (Poirel ve ark., 2012b).

Yanık ve arkadaşlarının (2013) 210 tane karbapeneme dirençli gram negatif bakteride yaptıkları çalışmada NDM-1 geninin varlığı PZR ile araştırılmış ve hiçbir izolatta bu genin pozitifliğine rastlanılmamıştır.

Alp ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada ise 94 karbapenemaz üreticisinin dört tanesinde tek başına ve bir tanesinde OXA-48 geni ile birlikte NDM-1 pozitifliği saptanmıştır. Raporlanan bu izolatlarla ülkemizden ilk yerli NDM-1 üreticileri bildirilmiştir.

Azap ve arkadaşlarının (2013) çalışmasında karbapenem dirençli 16 *K. pneumoniae* izolatı arasında NDM pozitifliğine rastlanmamışken Demir ve

arkadaşlarının (2015) yaptıkları çalışmada incelenen 95 adet *Enterobacteriaceae* izolatının altısında (% 10,5) NDM-1 geni saptanmıştır.

Çalışmamızda ise NDM geni iki bakteriyel izolatta (% 1,8) tanımlanmıştır. NDM geninin saptandığı her iki izolat da *K. pneumoniae* türündedir. NDM üreticilerinden biri kardiyoloji kliniğinden gönderilen bir idrar örneğinde saptanırken diğeri ise beyin cerrahisi kliniğinden gönderilen bir kan kültüründen elde edilmiştir.

Modifiye Hodge testi, rutin laboratuvarlarda karbapenemaz aktivitesini saptamak amacıyla yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemlerden biridir (Hammoudi ve ark., 2014). CLSI (2015) tarafından da karbapenemaz saptamada önerilen test, kolay kullanımı ve disk difüzyon testinde kullanılan malzemeler dışında ilave bir ekipman gerektirmemesi nedeniyle laboratuvarlarda çok yaygın bir kullanım kazanmıştır.

Fenotipik doğrulamada uzun zamandır kullanılmakta olan bu testin duyarlılık ve özgüllüğündeki düşüklüklere dair pek çok yayın yapılmıştır. Her ne kadar testin Sınıf A ve Sınıf D karbapenemazların saptanmasında yüksek duyarlılığa sahip olduğu ifade edilse de metalla-beta-laktamazların saptanmasında duyarlılığın düşük olduğu bildirilmektedir (Girlich ve ark., 2012; Hammoudi ve ark., 2014; Nordmann ve ark., 2012b ve Nordmann ve Poirel, 2013). Hatta CLSI (2014) kılavuzunda testin duyarlılık ve özgüllüğünün değişik karbapenemaz gruplarında değişebileceği ve örneğin NDM üreten izolatlar için duyarlılığın % 11 gibi oldukça düşük olabileceği ifade edilmektedir. Fakat kılavuzda Amerika'daki *Enterobacteriaceae* izolatlarının taramasına ve doğrulamasına dair veriler geniş şekilde toplandığı ve MHT'nin özellikle KPC üreten izolatlarda yüksek düzey duyarlılık (>%90) ve özgüllüğe (>%90) sahip olduğu bildirilmektedir. Kılavuzda karbapenemaz doğrulamasının sadece enfeksiyon kontrol ya da epidemiyolojik araştırma gibi amaçlarla yapılması ve doğrulamada MHT kullanılması önerilmektedir. CLSI (2015)'te MHT'ye ilaveten Carba NP testi de karbapenemaz doğrulama yöntemleri arasında önerilmektedir. Farklı metodların değerlendirildiği bir çalışmada, KPC üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının doğrulamasında karbapenem duyarlılık testini takiben yapılan MHT ikilisi önerilmiştir. Aynı çalışmada ertapenem direnciyle birlikte MHT pozitifliğinin KPC karbapenemazların saptanmasında yeterli duyarlılıkta olduğu bildirilmiştir

(Anderson ve ark., 2007). Girlich ve arkadaşlarının (2012) yaptıkları bir çalışmada MHT'nin Sınıf A (KPC) ve Sınıf D (OXA-48) karbapenemaz üreticilerini saptamada mükemmel duyarlılığa sahip olduğu bildirilmiştir. Pasteran ve arkadaşları (2009) Sınıf A karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* türlerini taramaya yönelik testlere dair çalışmalarında MHT ile iyi sonuçlar aldıklarını belirtmektedirler. Aynı çalışmada ertapenem, imipenem ve meropenem disklerinin her üçünün de denendiği ve aynı sonuçların alındığı bildirilmektedir. Fakat CLSI (2015) kılavuzunda MHT yapılırken ertapenem ve meropenem disklerinin kullanımı önerilmektedir. Lee ve arkadaşları (2010) MHT'nin Mueller-Hinton agarda yapıldığında imipenem yerine ertapenem diskini kullanmanın daha iyi sonuç vereceğini belirtmektedirler. MHT üzerine ayrıntılı inceleme yapılan yeni bir makalede ise her ne kadar CLSI ertapenem ve meropenem disklerini eşit şekilde önerse de meropenem diskinin daha düşük duyarlılığa sahip olduğu belirtilmektedir (Kim ve ark., 2015). Araştırma sonuçlarındaki farklılıklar özellikle MHT'nin Sınıf B karbapenemazlar olan metallo-beta-laktamazları saptamasındaki düşüklüklerden kaynaklanmaktadır. Galani ve arkadaşları (2008) MBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının % 4,2'sinde MHT'nin yalancı negatif sonuç verdiğini bildirmiştir. MHT'nin geliştiricileri olan Lee ve arkadaşları da (2010) testin orijinalinin MBL üreten *Pseudomonas spp.* ve *Acinetobacter spp.*'de bazen negatif ya da şüpheli sonuçlar verdiğini bildirdikten sonra MHT'nin Mueller-Hinton agar yerine MacConkey agarda yapılmasını önermektedir. Fakat yapılan başka bir çalışmada MHT'de MacConkey agar kullanımının NDM üreticilerini saptamada herhangi bir duyarlılık artışı sağlamadığı ifade edilmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar Mueller-Hinton agara ZnSO<sub>4</sub> ilavesinin (100 µg/mL) NDM üreticileri için testin duyarlılığını % 50'den % 85,7'ye yükselttiği bildirilmiştir (Girlich ve ark., 2012).

Çalışmamızda MHT testi iki şekilde yapılmıştır. İlk olarak Modifiye Hodge testi, CLSI'nın (2015) önerdiği şekilde *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland türbiditedeki süspansiyonu hazırlanarak bunun 1:10 oranında sulandırımı (0,05 McFarland) kullanılarak yapıldığında herhangi bir karbapenemaz geni pozitif bulunan 94 izolatın 87 tanesinde pozitif sonuç vermiştir. Kalan yedi izolatta ise modifiye Hodge testi yalancı negatif sonuç vermiştir. Karbapenemaz genleri

açısından negatif bulunan 18 izolatın 16 tanesinde ise modifiye Hodge testi ile yalancı pozitif sonuç alınmıştır.

Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) nerdiği şekliyle 1:10 sulandırım kullanılarak yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6; özgüllüğü ise % 11,1 olmaktadır.

Farklı karbapenemaz genleri için testin duyarlılıkları incelendiğinde bu oran OXA-48 geni pozitif bulunan izolatlarda % 92,2; VIM pozitiflerde % 88,9 ve NDM pozitiflerde ise % 100 olmaktadır. Metallo-β-laktamazları yakalamada ise testin duyarlılığı % 91 olarak hesaplanmıştır.

Testin duyarlılığının % 90'ın üzerinde yüksek bir değerde çıkmasında çalışmamıza dahil edilen izolatların çoğunun OXA-48 reticisi olmasının etkili olduğu düşünülmüştür. Çünkü Nordmann ve arkadaşlarının (2012b) yayınladıkları bir derlemede MHT'nin metallo-β-laktamazları yakalamadaki duyarlılık düşüklüğü bildirilmekle birlikte KPC ve OXA-48 reticilerinde testin iyi çalıştığı ifade edilmektedir. Girlich ve arkadaşlarının (2012) alışmalarında MHT'nin duyarlılığı % 77,4 ve özgüllüğü % 38,9 olarak bulunmuştur. Fakat çalışmaya dahil izolatların arasında önemli oranda NDM reticisi bakteriler yer almıştır ve bunların yarısı MHT ile negatif sonuç vermiştir. Dolayısıyla testin genel duyarlılığı, bizim çalışmamızdakine göre düşük bulunmuştur. Halbuki aynı çalışmada OXA-48 pozitif bulunan izolatların tamamında MHT pozitif sonuç vermiştir ve dolayısıyla OXA-48 reticileri için MHT'nin % 100 duyarlı olduğu ifade edilmiştir. Çalışmamızda ise OXA-48 reticileri için Girlich ve arkadaşlarının (2012) verdiği orana göre daha düşük (% 92,2) duyarlılık saptanmıştır. Fakat söz konusu çalışmada kullanılan OXA-48 pozitif izolat sayısı 10 tane ile sınırlı iken çalışmamızda bu sayı 90 olmuştur. OXA-48 reticilerinde elde edilen yalancı negatif sonuçların neye bağlı olduğunu belirlemek için ileri araştırmaların yapılması yararlı gözükmektedir.

Kim ve arkadaşlarının (2015) alışmalarında MHT'nin NDM üreticilerini yakalamadaki duyarlılığını farklı indikatör diskler, inokülüm yoğunluğu ve besiyerleri ile araştırmışlar ve en iyi sonuç aldıkları yöntemde bile duyarlılığı % 68 bulmuşlardır. Girlich ve arkadaşları (2012) ise NDM-1 reticilerinde bu oranı % 50 olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise NDM reticilerinde duyarlılık % 100 olarak

tespit edilmişse de NDM pozitif izolat sayısı sadece iki tane olduğundan, literatürle uyumsuzluğun test edilen örnek sayısının azlığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çalışmamızda MHT'nin metallo- $\beta$ -laktamazları yakalama duyarlılığı da % 91 gibi yüksek bir oranda bulunmuştur. Halbuki Miriagou ve arkadaşları (2010) MHT'nin Sınıf B karbapenemazları saptama problemleri olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve arkadaşları (2015) ise yaptıkları çalışmada MHT'nin MBL üreticilerinin en fazla % 60,6'sını tespit edebildiğini bildirmişlerdir. Fakat araştırmacılar testin performansının MBL tipine göre değiştiğini ve VIM üreticilerinde NDM üreticilerine göre daha iyi sonuç alındığı bildirilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz yüksek duyarlılık oranı hem MBL pozitif izolatların çoğunluğunu VIM üreticilerinin oluşturması, hem de VIM pozitif izolatların çoğunda aynı zamanda OXA-48 pozitifliği de bulunması ile açıklanabilir.

Çalışmamızda ikinci olarak modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği 1:10 oranında sulandırım adımı atlanarak *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland türbiditedeki süspansiyonu ile yapılmıştır. MHT bu şekilde yapıldığında yalancı negatiflik sayısı 3'e düşmüştür. Testi değerlendirirken araştırılan izolatın inhibisyon zonuna doğru yaptığı hafif girintiler de pozitif olarak yorumlanmıştır. Buna göre testin özgüllüğünde değişme olmazken duyarlılığı % 96,8'e yükselmiştir. Sulandırım adımı atlanarak yapılan testte OXA-48 üreticileri için duyarlılık % 96,7'ye yükselirken VIM ve NDM üreticilerinde bu değer % 100 olmuştur.

Lee ve arkadaşlarının (2010) yaptıkları çalışmada MHT MacConkey agarda yapıldığında düşük inokülüm konsantrasyonunun testin performansını artırmadığını bildirmişlerdir. Kim ve arkadaşları (2015) ise laboratuvarlarda MHT yapılırken 1:10'luk sulandırım basamağının atlanmasını önermektedir. Çünkü yaptıkları çalışmada sulandırım adımının testin duyarlılığında artışa neden olmadığını, hatta düşük inokülümden kaynaklanan zayıf üremelerin yalancı negatif bildirimlere neden olabileceğini ifade etmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular da literatürlerde bildirilenlere uyumlu olup MHT yapılırken CLSI'nın (2015) önerdiği sulandırım adımının atlanılmasının

hem daha güvenilir sonuç elde etmek, hem de iş yükünü azaltmak açısından daha faydalı olacağını göstermektedir.

Dünya genelinde karbapenemaz üreticileriyle ortaya çıkan küçük ya da büyük çaptaki pek çok salgın durumu bildirilmektedir. Voulgari ve arkadaşları (2013) Yunanistan'da 2011 Aralık-2012 Mart ayları arasında dokuz hastadan izole ettikleri 13 ertapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatını incelemişler ve izolatlarının tamamının OXA-48 geni taşıdıklarını ve tek bir PFGE klonuna ait olduğunu saptamışlardır. MLST sonucuna göre sekans tipi ST11 olarak belirlenen izolatlar ile ortaya çıkan bu salgının, Yunanistan'da OXA-48 üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarının neden olduğu ilk salgın durumu olduğu bildirilmiştir.

Ducomble ve arkadaşlarının (2015) Almanya'da bir hastanede 2010 Haziran-2012 Temmuz ayları arasında KPC-2 üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan geniş bir hastane salgınına bildirmişlerdir.

Fransa'da bir üniversite hastanesinde bildirilen büyük çaptaki bir salgında ise indeks vakadaki OXA-48 üreten izolatın geç tanımlanmasının da katkısıyla üç farklı bölümde 15 aylık dönem içerisinde 72 sekonder vaka ortaya çıktığı ve salgının zor kontrol edilebildiği bildirilmiştir (Semin-Pelletier ve ark., 2015).

Ülkemizde OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan ilk salgın 2008 yılında bildirilmiştir. İstanbul Çapa'daki tıp fakültesinde ortaya çıkan bu salgında 2006 Mayıs-2007 Şubat ayları arasında toplanan 39 izolatın iki klona ait olduğu ve her iki klondaki izolatların hepsinin OXA-48 üreticisi olduğu saptanmıştır (Carrër ve ark., 2008).

Carrër ve arkadaşlarının (2010) yaptığı ve çoğunluğu Türkiye'den izole edilen OXA-48 üreticisi *Enterobacteriaceae* izolatlarını inceledikleri çalışmada OXA-48 geninin yayılımının belli bir *K. pneumoniae* klonu aracılığıyla olmadığı bildirilmiştir.

Levast ve arkadaşlarının (2011) yayınladıkları bir araştırmada ise 2010 yılında Türkiye'den Fransa'ya giden gebe bir kadının taşıdığı OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatı ile ortaya çıkan küçük bir salgın bildirilmiştir.

Çalışmamızda PFGE ile incelenen izolatlar arasında *K. pneumoniae* türündeki 10 izolat aynı PFGE paternine sahip bulunmuş ve pulsotip B olarak isimlendirilmiştir. Pulsotip B’de yer alan izolatların bir tanesi hariç hepsi (n=9) yoğun bakımlardan izole edilmiş olup yoğun bakımlardaki bu kümelenme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,002). Yoğun bakımlar arasında da çoğunluğu reanimasyon ünitesinden izole edilen suşlar oluşturmaktadır (p=0,031). Örneklerin laboratuvara kabul tarihleri incelendiğinde ise tamamının 2013 yılı sonu ve 2014 yılı ilk yarısında olduğu belirlenmiştir. Pulsotip B’de yer alan 10 izolatın tamamında OXA-48 pozitifliği görülürken izolatların hiçbirinde NDM ya da VIM pozitifliğine rastlanmamıştır. İzolatların antibiyotik direnç paternleri de birbirine benzer olarak saptanmıştır. Tüm bu bulgular, İbni Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde OXA-48 üreticisi *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan muhtemel bir salgın olarak düşünülmüştür.

Karbapenemaz üreticileri ile enfeksiyon çoğunlukla hastane kökenli olmakla birlikte toplum kökenli izolatlar da rastlanılmaktadır (Canton ve ark., 2012). KPC üreticileri çoğunlukla nozokomiyal izolatlar arasında tanımlanırken NDM ve OXA-48 üreticilerine hem nozokomiyal hem de toplum kaynaklı patojenler arasında rastlanabilmektedir (Nordmann ve Poirel, 2014).

Tsakris ve arkadaşlarının (2007) yaptıkları çalışmada bir yıllık zaman diliminde polikliniğe başvuran hastalardan alınan örneklerde izole edilen imipenem dirençli *P. mirabilis* izolatları toplanmış ve bunlardan 12’si metallo-β-laktamaz üreticisi bulunmuştur. Toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonu geçiren bu hastaların hepsinin Yunanistan’daki bölgesel bir hastanede yatış ve tedavi hikayeleri bulunmaktadır. Aynı klondan köken alan izolatların tamamında VIM-1 geni tanımlanmıştır.

Avustralya Antimikrobiyal Direnç Grubunun 2012 yılında yaptıkları ve toplum kökenli enfeksiyonlara odaklandıkları çalışmada idrar yolu örnekleri değerlendirilmiş ve bir hastada IMP-4 karbapenemaz üreten *E. cloacae* izolatına rastlanmıştır (Turnidge ve ark., 2014). Nordmann ve arkadaşlarının (2012d) yayınladıkları bir makalede ise Fransa’da yaşayan ve NDM üreticilerinin endemik olduğu ülkelere seyahat hikayesi olmayan 83 yaşındaki bir kadın hastada çoklu ilaca dirençli *K.*

*pneumoniae* izolatu ile gelişen inatçı bir sistit vakası tanımlanmış ve izolatu NDM-1 ve CTX-M-15 genleri taşıdığı bildirilmiştir.

Senegal'den yapılan bir bildirimde ise bölgede OXA-48 üreticilerinin hem hastane şartlarında hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlarda görülmeye başladığı ifade edilmiştir (Moquet ve ark., 2011).

Tropik bölgeler gibi endemik yerlere seyahat sonrası çoklu ilaç direncine sahip *Enterobacteriaceae* taşıyıcılığı oranının yüksek olduğu fakat taşıyıcılık süresinin kısa olduğu bildirilmişse de (Ruppé ve ark., 2015) başka bir yayında NDM-1 pozitif *E. coli* izolatu ile kolonize bir hastanın takibinde bu bakterinin bir yılın üzerindeki süre zarfında intestinal florada kaldığı ve bu nedenle taşıyıcıların dünya genelinde taranmasının önemli olduğu vurgulanmıştır (Poirel ve ark., 2011b).

Çalışmamızda da polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen örneklerde karbapenemaz genlerine rastlanmıştır. Gelen örneklerden üçü idrar örneği olup OXA-48 geni pozitifliği görülmüştür. İzolatların tamamı *K. pneumoniae* türüne aittir. Bunlardan biri PFGE analizinde pulsotip A ile uyumlu bulunmuştur ve 22 gün önce prostatektomi operasyonu geçirmiştir. Bu durum izolatu hastanede yatışı sırasında kazanıldığını düşündürmüştür. Diğer iki hastadan birinin altı ay önce geçirilmiş tiroidektomi operasyonu hikayesi varken diğerinde yakın zamanda hastaneye yatış hikayesi bulunmamaktadır. Poliklinik hastalarından gelen diğer iki örnekten birinde OXA-48 ve VIM genleri birlikte pozitif olan *K. pneumoniae* izolatu, diğerinde ise yine OXA-48 ve VIM birlikteliği gösteren *E. cloacae* izolatu tanımlanmıştır. Her iki izolat da yara örneklerinden elde edilmiş olup hastaların yakın dönemde ortopedi kliniğine yatış ve cerrahi hikayeleri vardır fakat iki hastanın başvuru dönemleri arasında yedi aylık bir zaman dilimi farkı vardır.

Tüm bu bulgular, OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu ülkemizde karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu toplum kökenli enfeksiyonların karşımıza çıkabileceğini düşündürmüştür. Böyle bir fenomenin bilinmesi ve uzun süreli tedaviye rağmen düzelmeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda akla getirilmesi yararlı gözükmektedir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karbapenemazlar, en kuvvetli  $\beta$ -laktamaz enzimleri olup neredeyse tüm  $\beta$ -laktamları hidrolize edebilmektedir. GSBL üreticisi mikroorganizmaların tedavisinde kullandığımız en önemli silah olan karbapenem grubu antibiyotikler, karbapenemaz enzimlerinin yaygınlaşmasıyla elimizden çıkma tehlikesi ile karşı karşıya kalmıştır. Hem karbapenemaz üreticileriyle ortaya çıkan enfeksiyonların tedavilerini doğru yönlendirmek, hem de bu bakterilerin yayılımını durdurmak için doğru tarama ve tanımlama stratejilerine ihtiyaç bulunmaktadır.

1. Çalışmamızda bu amaçla 112 klinik örnekten elde edilen 112 bakteriyel izolat incelenmiş olup izolatların çoğunluğunu *K. pneumoniae* (%70,5) oluşturmakta iken bunu sırasıyla *E. coli* (% 13,4), *E. cloacae* (% 8,9), *E. aerogenes* (% 3,6) ve *K. oxytoca* (% 3,6) takip etmiştir.
2. İzolatlarda en sık olarak OXA-48 geninin varlığı saptanmıştır. Bakteriyel izolatların 83 tanesinde (% 74,1) tek başına, yedi tanesinde (% 6,3) ise VIM geni ile birlikte OXA-48 tespit edilmiştir.
3. Çalışmamızda her bir *Enterobacteriaceae* türünde OXA-48 pozitifliği hakim profil olmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarında % 76'sında tek başına, % 5'inde VIM ile birlikte olmak üzere bu oran % 81 olmuştur. Aynı oran *E. coli* izolatlarında % 93,3 iken *Enterobacter* türlerinde % 57,1 olarak hesaplanmıştır. Çalışmaya dahil edilen dört tane *K. oxytoca* izolatının hepsinde OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. OXA-48 tipi karbapenemazların türler arasındaki dağılımında ise anlamlı farklılık bulunmamıştır ( $p=0,117$ ).
4. Yapılan araştırmalar da, ülkemizde OXA-48 üreticilerinin endemik olduğunu teyit etmektedir (Alp ve ark., 2013; Azap ve ark., 2013; Demir ve ark., 2015 ve Kılıç ve ark, 2011). Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 137 hastadan izole edilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae*'lerin dahil edildiği bir çalışmada izolatların 94 tanesinde karbapenamaz genlerine rastlanmış ve bunların % 91,5'i tek başına OXA-48 üreten izolatlar olmuştur (Alp ve ark., 2013).

5. Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta VIM geninin varlığı saptanmış olup toplam dokuz bakteride (% 8) pozitif olarak bulunmuştur. Bunlardan yedi tanesinde aynı zamanda OXA-48 geni de pozitif bulunurken diğer iki tanesinde sadece VIM geni pozitif olarak belirlenmiştir.
6. Türkiye’de ilk defa 2007 yılında çoklu ilaç dirençli ve CTX-M-15 pozitif bir *K. pneumoniae* klinik izolatında VIM-1 metallo-β-laktamaz geni saptanmıştır (Yıldırım ve ark., 2007) ve giderek yaygınlaşan bu gen, ülkemizde ve Yunanistan’da problem haline gelmiştir (Walsh ve ark., 2010).
7. Çalışmamızda NDM geni iki bakteriyel izolatta (% 1,8) tanımlanmıştır. NDM geninin saptandığı her iki izolat da *K. pneumoniae* türündedir.
8. Ülkemizde uzun bir süre NDM bildirimi yapılmamış olup ilk kez 2011 Ekim ayında importe bir vakada gösterilmiştir. Alp ve arkadaşlarının (2013) yaptıkları çalışmada ise 94 karbapenemaz üreticisinin beş tanesinde NDM-1 pozitifliği saptanmıştır ve bunlar ülkemizden bildirilen ilk yerli NDM üreticileri olmuştur. Yapılan diğer çalışmalar da NDM üreticilerinin ülkemizde yaygınlaşmakta olduğunu göstermektedir (Azap ve ark., 2013; Demir ve ark., 2015).
9. Test edilen tüm izolatlar için en yüksek direnç görülen antimikrobiyal ajanlar sefazolin (% 100) ve amoksisilin-klavulanik asit (% 99,1) olmuştur. En az direnç görülen antimikrobiyal ajanlar ise amikasin (% 19,6) ve gentamisin (% 29,5) olmuştur. Kombine tedavilerin tercih edildiği karbapenemaz üreticileriyle gelişen enfeksiyonlarda, aminoglikozitlerin elimizdeki en önemli seçeneklerden biri olduğu görülmüştür.
10. Karbapenemler için *E. coli* suşlarında direnç, anlamlı oranda düşük bulunmuştur ve p değerleri imipenem için p=0,014, meropenem için p=0,001 ve doripenem için p<0,001 olarak belirlenmiştir. Gentamisin içinse *E. coli* suşları daha yüksek direnç göstermiştir (p=0,01). Enterobacter türlerinde ise kinolonlara direnç, diğer türlere göre anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ve p değerleri siprofloksasin ve levofloksasin için sırasıyla 0,001 ve 0,018 olarak hesaplanmıştır.
11. Çalışmaya dahil edilen 112 izolattan 43 tanesi (% 38,4) fenotipik yöntemlerle GSBL pozitif olarak belirlenmiştir.

12. Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği şekliyle 1:10 sulandırım kullanılarak yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6; özgüllüğü ise % 11,1 bulunmuştur. Farklı karbapenemaz genleri için testin duyarlılıkları incelendiğinde bu oran OXA-48 geni pozitif bulunan izolatlarda % 92,2; VIM pozitiflerde % 88,9 ve NDM pozitiflerde ise % 100 olmuştur. Metallo- $\beta$ -laktamazları yakalamada ise testin duyarlılığı % 91 olarak hesaplanmıştır.
13. Her ne kadar EUCAST (2015) kılavuzunda önerilmese de OXA-48 üreticilerinin çok yaygın olarak karşımıza çıktığı ülkemizde, karbapenemaz doğrulamasında MHT yapılması önemli bir alternatif olarak gözükmektedir. Fakat testin özgüllüğü düşük olup yalancı pozitif sonuçlarla karşılaşılabilceğinin göz önünde bulundurulması gerekmektedir.
14. Modifiye Hodge testi, CLSI'nın (2015) önerdiği sulandırım adımı atlanarak yapıldığında OXA-48 üreticileri için duyarlılık % 96,7'ye yükselirken VIM ve NDM üreticilerinde bu değer % 100 olmuştur. Dolayısıyla MHT yapılırken CLSI'nın (2015) önerdiği sulandırım adımının atlanılması; hem daha güvenilir sonuç elde etmek, hem de iş yükünü azaltmak açısından daha faydalı gözükmektedir.
15. Çalışmamızda PFGE ile incelenen izolatlar arasında *K. pneumoniae* türündeki 10 izolat aynı PFGE paternine sahip bulunmuş ve pulstip B olarak isimlendirilmiştir. Pulstip B'de yer alan izolatların bir tanesi hariç hepsi (n=9) yoğun bakımlardan izole edilmiş olup yoğun bakımlardaki bu kümelenme istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p=0,002). Yoğun bakımlar arasında da çoğunluğu reanimasyon ünitesinden izole edilen suşlar oluşturmaktadır (p=0,031). Örneklerin laboratuvara kabul tarihleri incelendiğinde ise tamamının 2013 yılı sonu ve 2014 yılı ilk yarısında olduğu belirlenmiştir. Pulstip B'de yer alan 10 izolatın tamamında OXA-48 pozitifliği görülürken izolatların hiçbirinde NDM ya da VIM pozitifliğine rastlanmamıştır. İzolatların antibiyotik direnç paternleri de birbirine benzer olarak saptanmıştır. Tüm bu bulgular, İbni Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde OXA-48 üreticisi *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan muhtemel bir salgın olarak düşünülmüştür.

16. Çalışmamızda polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen klinik örneklerde karbapenemaz genlerine rastlanmıştır. Hastalardan bazılarının yakın dönemde hastanemizde yatış hikayesi varken bazılarında bulunmamaktadır. Polikliniğe başvuran hastalarda böyle bir durumun görülmesi, OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu ülkemizde karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu toplum kökenli enfeksiyonların karşımıza çıkabileceğini düşündürmüştür. Böyle bir fenomenin bilinmesi ve uzun süreli tedaviye rağmen düzelmeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda akla getirilmesi yararlı gözükmemektedir.

## ÖZET

### Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram Negatif Enterik Bakterilerde Karbapenemaz Varlığının ve Tiplerinin Araştırılması

Çalışmamızda Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina hastanesi Merkez Laboratuvarına 2010-2014 yılları arasında çeşitli kliniklerden gönderilen karbapenem direnci gösteren *Enterobacteriaceae* suşlarında antibiyotik duyarlılık paternleri ve karbapenemaz genleri araştırılarak ülkemize yönelik epidemiyolojik veri sağlamak amaçlanmaktadır. Elde edeceğimiz veriler Türkiye'deki epidemiyolojik verilere önemli bir katkı sağlayacak, yeni tedavi algoritmalarının geliştirilmesinde ve tedavinin yönlendirilmesinde yol gösterici olacaktır.

Çeşitli kliniklerden alınmış, Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson, ABD) ile identifiye edilerek antibiyotik duyarlılık testleri sonucunda ertapeneme karşı orta duyarlı ya da dirençli bulunan 112 izolat çalışmaya alınmıştır. Tüm izolatlara Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testleri yapılarak 17 antibiyotik için (amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), piperasilin-tazobaktam (100/10 µg), sefazolin (30 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), sefoksitin (30 µg), aztreonam (30 µg), doripenem (10 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), siprofloksasin (5 µg), levofloksasin (5 µg), trimetoprim-sülfametoksazol (1.25/23.75 µg)) duyarlılık sonuçları belirlenmiştir. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine ek olarak ertapenem ve meropenem stripleri kullanılarak gradiyent difüzyon yöntemiyle izolatların karbapenem MİK değerleri belirlenmiştir. Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği sulandırım basamağı yapılarak ve bu basamak atlanarak iki farklı şekilde yapılmıştır ve testin karbapenemaz varlığını saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü değerlendirilmiştir. Bakteriyel izolatlardan DNA ekstraksiyonu yapıp polimeraz zincir reaksiyonu yardımıyla 11 adet kazanılmış karbapenemaz geni incelenmiştir. İzolatlar arasındaki klonal ilişki, izolatların XbaI DNA makrorestriksiyon enzimi ile kesimi sonrası PFGE yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışmamızda 112 bakteriyel izolat incelenmiş olup izolatların çoğunluğunu *K. pneumoniae* (% 70,5) oluşturmakta iken bunu sırasıyla *E. coli* (%13,4), *E. cloacae* (% 8,9), *E. aerogenes* (% 3,6) ve *K. oxytoca* (% 3,6) takip etmiştir. İzolatlarda en sık olarak OXA-48 geninin varlığı saptanmıştır. Bakteriyel izolatların 83 tanesinde (% 74,1) tek başına, yedi tanesinde (% 6,3) ise VIM geni ile birlikte OXA-48 tespit edilmiştir. Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta VIM geninin varlığı saptanmış olup toplam dokuz bakteride (% 8) pozitif olarak bulunmuştur. NDM geni ise iki bakteriyel izolatta (% 1,8) tanımlanmıştır. Test edilen tüm izolatlar için en yüksek direnç görülen antimikrobiyal ajanlar sefazolin (% 100) ve amoksisilin-klavulanik asit (% 99,1) olmuştur. En az direnç görülen antimikrobiyal ajanlar ise amikasin (% 19,6) ve gentamisin (% 29,5) olmuştur. Modifiye Hodge testi CLSI'nın (2015) önerdiği şekliyle 1:10 sulandırım kullanılarak yapıldığında testin duyarlılığı % 92,6; özgüllüğü ise % 11,1 bulunmuştur. Sulandırım adımı atlanarak yapıldığında OXA-48 üreticileri için duyarlılık % 96,7'ye yükselirken VIM ve NDM üreticilerinde bu değer % 100 olmuştur. Çalışmamızda PFGE ile incelenen izolatlar arasında *K. pneumoniae* türündeki 10 izolat aynı PFGE paternine sahip bulunmuş ve pulsotip B olarak isimlendirilen bu izolatlar, izole edildikleri yer, izolasyon tarihleri, antibiyotik direnç paternleri ve taşıdıkları

karbapenemaz genleri açısından benzer bulunmuştur ve hastanemiz yoğun bakımlarında ortaya çıkan muhtemel bir salgın olarak değerlendirilmiştir. Çalışmamızda ayrıca polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen klinik örneklerde karbapenemaz genlerine rastlanmıştır. Polikliniğe başvuran hastalarda böyle bir durumun görülmesi, OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu ülkemizde karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu toplum kökenli enfeksiyonların karşımıza çıkabileceğini düşündürmüştür.

Karbapenemazların hızlı ve doğru tanısı, tedavi stratejilerini belirlemede ve yayılımı önlemede anahtar rol almaktadır. Kombine tedavilerin tercih edildiği karbapenemaz üreticileriyle gelişen enfeksiyonlarda, aminoglikozitler elimizdeki en önemli seçeneklerden biri olarak gözükmektedir. Her ne kadar EUCAST (2015) kılavuzunda önerilmese de OXA-48 üreticilerinin çok yaygın olarak karşımıza çıktığı ülkemizde, karbapenemaz doğrulamasında modifiye Hodge testi yapılması önemli bir alternatif olarak gözükmektedir. Fakat testin özgüllüğü düşük olup yalancı pozitifliklerin olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Ülkemiz gibi belirli bir karbapenemaz geninin yaygın olduğu bölgelerde, uzun süreli tedaviye rağmen düzelmeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda, karbapenemaz üreticisi etkenlerin sorumlu olabileceği akla getirilmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** *Enterobacteriaceae*, karbapenem direnci, karbapenemaz, OXA-48, *pulsed-field* jel elektroforezi

## SUMMARY

### **Prevalance and Genetic Evaluation of Carbapenemase Production among Gram-negative Enteric Bacteria Isolated from Various Human Clinical Specimens**

In this study, it is aimed to obtain national epidemiologic data by examining antibiotic sensitivity patterns and carbapenemase genes for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* delivered to Central Laboratory of Ibni Sina Hospital, Faculty of Medicine, Ankara University from various clinics between years 2010 – 2014. Obtained data will provide important contribution for epidemiologic data in Turkey and will be a guiding light on the developmet of the up to date treatmet algorithms.

112 isolates which were collected from various clinics, appeared to be intermediate or resistant to ertapenem as a result of antibiotic susceptibility tests were examined and identified by Phoenix automated microbiology system (Becton Dickinson, USA). All isolates were tested for antibiotic susceptibility by Kirby-Bauer disk diffusion method for 17 following antibiotics (Amoxicillin/Clavulanic Acid (20/10 µg), Piperacillin/Tazobactam 100/10 µg), Cefazolin (30 µg), Cefepime (30 µg), Ceftazidime (30 µg), Cefotaxime (30 µg), Cefoxitin (30 µg), Aztreonam (30 µg), Doripenem (10 µg), Ertapenem (10 µg), Imipenem (10 µg), Meropenem (10 µg), Gentamicin (10 µg), Amikacin (30 µg), Ciprofloxacin (5 µg), Levofloxacin (5 µg), Trimethoprim - Sulfametoxazol (1.25/23.75 µg)). In addition to Kirby-Bauer disk diffusion method, isolates' carbapenem MIC values were determined by gradient diffusion method using ertapenem and meropenem test strips. Modified Hodge test was applied in two ways either with dilution step which is also suggested by CLSI (2015) or skipping this step; and sensitivity and specificity of the test for carbapenemase detection was evaluated. After DNA extraction from the bacterial isolates, 11 acquired carbapenemase genes were examined by polymerase chain reaction. The clonal relationship among the isolates was determined by PFGE method following digestion with XbaI DNA macrorestriction endonuclease.

In our study 112 bacterial isolates were examined and *K. pneumoniae* appeared to be the majority of isolates (70,5 %) and *E. coli* (13,4 %), *E. cloacae* (8,9 %), *E. aerogenes* (3,6 %) and *K. oxytoca* (3,6 %) respectively. OXA-48 gene positivity was found to be the most prevalent. In 83 bacterial isolates (74,1 %) OXA-48 was found alone and in other seven (6,3 %) it was identified with VIM gene coexistence. Existence of VIM gene was identified in second frequency among the carbapenemase genes, it was found positive in nine bacteria (8 %). NDM gene was identified in two bacterial isolates (1,8 %). Among all the isolates, cefazolin (100 %) and amoxicillin/clavulanic acid (99,1 %) showed highest resistance. Amikacin (19,6 %) and gentamicin (29,5 %) had lowest resistance rates for antimicrobial agents tested. Modified Hodge test's sensitivity was 92,6 % with 1:10 dilution as suggested by CLSI (2015) and the specifity of the test was 11,1 %. Skipping the step of dilution, sensitivity was rised to 96,7 % for OXA-48 producers as for VIM and NDM producers this value was 100 %. In our study 10 *K. pneumoniae* isolates had the same PFGE pattern among the isolates, named as pulsotype B, evaluated as a probable intensive care unit outbreak since they carry similar carbapenemase genes and have similar antibiotic resistance patterns, isolation locations and dates. On the other hand carbapenemase genes were seen in the

clinical samples collected from five out-patients. We therefore think that community-acquired infections may arise due to carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in our country where OXA-48 producers are endemic.

Rapid and accurate detection of carbapenemases plays an important role in defining treatment strategies and preventing the spread. Aminoglycoside antibiotics have appeared to be one of the most important alternatives for infections due to carbapenemase producers which are preferred to be treated by combined therapies. Although it is not preferred in EUCAST (2015) guideline, in our country where OXA-48 producers are commonly seen, modified Hodge test has become an important alternative for carbapenemase confirmation. However it should be taken under consideration its low specificity and that false positivity could occur. In endemic areas for a specific carbapenemase gene, as in our country, it should also be thought that carbapenemase producers may be responsible for community-acquired infections that could not be treated despite long lasting treatments.

**Key Words:**, Carbapenem resistance, carbapenemase genes, *Enterobacteriaceae*, OXA-48, pulsed-field gel electrophoresis

## KAYNAKLAR

- ABRAHAM EP, CHAIN E (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* **146**: 837.
- ADLER A, NAVON-VENEZIA S, MORAN-GILAD J, MARCOS E, SCHWARTZ D, CARMELI Y (2011). Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *Journal of Clinical Microbiology* **49** (6): 2239-2242.
- AKTAS Z, KAYACAN CB, SCHNEIDER I, CAN B, MIDILLI K, BAUERFEIND A (2008). Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase, OXA-48, Persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* **54** (2): 101-106.
- ALP E, PERCIN D, COLAKOGLU S, DURMAZ S, KURKCU CA, EKINCIOGLU P, GUNES T (2013). Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *The Journal of Hospital Infection* **84** (2): 178-180.
- AMBRETTI S, GAIBANI P, BERLINGERI A, CORDOVANA M, TAMBURINI MV, BAU G, LANDINI MP, SAMBRI V (2013). Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resistance* **19** (3): 212-215.
- ANDERSON KF, LONSWAY DR, RASHEED JK, BIDDLE J, JENSEN B, MCDUGAL LK, CAREY RB, THOMPSON A, STOCKER S, LIMBAGO B, PATEL JB (2007). Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **45** (8): 2723-2725.
- AUBRON C, POIREL L, ASH RJ, NORDMANN P (2005). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerging Infectious Diseases* **11** (2): 260-264.
- AVLAMI A, BEKRIS S, GANTERIS G, KRANIOTAKI E, MARAMOU-LADA E, ORFANIDOU M, PANIARA O, PANTAZATOU A, PAPAGIANNITSIS CC, PLATSOUKA E, STEFANOI I, TZELEPI E, VAGIAKOU H, MIRIAGOU V (2010). Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *Journal of Microbiological Methods* **83** (2): 185-187.
- AZAP O, OTLU B, YESİLKAYA A, YAKUPOGULLARI Y (2013). Detection of OXA-48-like Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology. *Balkan Medical Journal* **30** (2): 259-260.
- BOGDANOVICHT, ADAMS-HADUCH JM, TIAN GB, NQUYEN MH, KWAK EJ, MUTO CA, DOI Y (2011). Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. *Clinical Infectious Diseases* **53** (4): 373-376.

- BUDAK S, AKTAŞ Z, ERDEM H (2012). Enterik gram-negatif bakterilerde laboratuvar dan kliniğe karbapenemazlar. *Mediterranean Journal of Infection Microbes & Antimicrobials* **1**: 1-11.
- BUSH K (2010). Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care* **14** (3): 224-231.
- BUSH K, JACOBY GA (2010). Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (3): 969-976.
- BUSH K, FISHER JF (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* **65**: 455-478.
- CAGNACCI S, GUALCO L, ROVETA S, MANNELLI S, BORGIANNI L, DOCQUIER JD, DODI F, CENTANARO M, DEBBIA E, MARCHESE A, ROSSOLINI GM (2008). Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase: first Italian outbreak. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61** (2): 296–300.
- CANTÓN R, AKOVA M, CARMELI Y, GISKE CG, GLUPCZYNSKI Y, GNIADKOWSKI M, LIVERMORE DM, MIRIAGOU V, NAAS T, ROSSOLINI GM, SAMUELSEN Ø, SEIFERT H, WOODFORD N, NORDMANN P (2012). Rapid evaluation and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 413–431.
- CANTÓN R, CANUT A, MOROSINI MI, OLIVER A (2014). Breakpoints for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: is the problem solved? *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica* **32** (4): 33-40.
- CARRÈR A, POIREL L, ERAKSOY H, CAGATAY AA, BADUR S, NORDMANN P (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52** (8): 2950-2954.
- CARRÈR A, POIREL L, YILMAZ M, AKAN O.A, FERIHA C, CUZON G, MATAR G, HONDERLICK P, NORDMANN P (2010). Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (3): 1369-1373.
- CASTANHEIRA M, TOLEMAN MA, JONES RN, SCHMIDT FJ, WALSH TR (2004). Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (12): 4654–4661.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2014). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fourth Informational Supplement, CLSI Document M100-S24, CLSI, Wayne PA.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth Informational Supplement, CLSI Document M100-S25, CLSI, Wayne PA.

- DEMİR Y, ZER Y, KARAOĞLAN I (2015). Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences* **28** (3): 1127-1133.
- DESPHANDE P, RODRIQUES C, SHETTY A, KAPADIA F, HEDGE A, SOMAN R (2010a). New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) in *Enterobacteriaceae*; treatment options with carbapenems compromised. *The Journal of the Association of Physicians of India* **58**: 147-149.
- DESPHANDE P, SHETTY A, KAPADIA F, HEDGE A, SOMAN R, RODRIQUES C (2010b). New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? *Clinical Infectious Diseases* **51** (10): 1222.
- DOI Y, PATERSON DL (2015). Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine* **36** (1): 74-84.
- DORTET L, POIREL L, NORDMANN P (2012). Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (12): 6437-6440.
- DORTET L, POIREL L, NORDMANN P (2014a). Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. *BioMed Research International* **2014**: Article ID 249856.
- DORTET L, CUZON G, NORDMANN P (2014b). Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2012. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69** (3): 623-627.
- DUCOMBLE T, FAUCHEUX S, HELBIG U, KAISER UX, KONIG B, KNAUST A, LUBBERT C, MOLLER I, RODLOFF AC, SCHWEICKERT B, ECKMANN T (2015). Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. *The Journal of Hospital Infection* **89** (3): 179-185.
- EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. 2015. Erişim adresi: [<http://www.eucast.org>] Erişim tarihi: 14/07/2015.
- EUCAST WEB SAYFASI. MIC distributions and ECOFFs. Erişim adresi: [[www.mic.eucast.org](http://www.mic.eucast.org)] Erişim tarihi: 19/06/2015.
- EUCAST WEB SAYFASI. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance (2012). Erişim adresi: [[www.eucast.org/resistance\\_mechanisms](http://www.eucast.org/resistance_mechanisms)] Erişim tarihi: 15/06/2015.
- GALANI I, REKATSINA PD, HATZAKI D, PLACHOURAS D, SOULI M, GIAMARELLOU H (2008). Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61** (3): 548-553.

- GARCÍA-FERNÁNDEZ A, VILLA L, MOODLEY A, HASMAN H, MIRIAGOU V, GUARDABASSI L, CARATTOLI A (2011). Multilocus sequence typing of IncN plasmids. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (9): 1987-1991.
- GAZIN M, PAASCH F, GOOSSENS H, MALHOTRA-KUMAR S, MOSAR WP2 and SATURN WP1 STUDY TEAMS (2012). Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum-beta-lactamase-harboring and carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **50** (4): 1140-1146.
- GIAKKOUPIS P, TZOUVELEKIS LS, TSAKRIS A, LOUKOVA V., SOFIANOU D, TZELEPI E (2000). IBC-1, a novel integron-associated class A  $\beta$ -lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (9): 2247-2253.
- GIRLICH D, POIREL L, NORDMANN P (2010). Novel Ambler Class A Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* Isolate from the Seine River, Paris, France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (1): 328-332.
- GIRLICH D, POIREL L, NORDMANN P (2012). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **50** (2): 477-479.
- GIRLICH D, POIREL L, NORDMANN P. (2013). Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **75** (2): 214-217.
- GLUPCZYNSKI Y, HUANG TD, BOUCHAHROUF W, REZENDE DE CASTRO R, BAURAING C, GÉRARD M, VERBRUGGEN AM, DEPLANO A, DENIS O, BOGAERTS P (2012). Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *International Journal of Antimicrobial Agents* **39** (2): 168-172.
- GULMEZ D, WOODFORD N, PALEPOU MF, MUSHTAQ S, METAN G, YAKUPOGULLARI Y, KOCAGOZ S, UZUN O, HASCELIK G, LIVERMORE DM (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents* **31** (6): 523-526.
- HAMMOUDI D, MOUBARECK CA, SARKIS DK (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *Journal of Microbiological Methods* **107**: 106-118.
- HARTL R, WIDHALM S, KERSCHNER H, APFALTER P (2013). Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* **19** (5): E230-232.
- HODGE W, CIAK J, TRAMONT EC (1978). Simple method for detection of penicillinase-producing *Neisseria gonorrhoeae*. *Journal of Clinical Microbiology* **7** (1): 102-103.

- HUGONNET JE, TREMBLAY LW, BOSHOFF HI, BARRY CE, BLANCHARD JS(2009). Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* **323**: 1215–1218.
- KILIC A, AKTAS Z, BEDIR O, GUMRAL R, BULUT Y, STRATTON C, TANG Y, BASUSTAOGLU AC (2011). Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in Turkey. *Annals of Clinical & Laboratory Science* **41** (2): 161-166.
- KIM H, PARK JS, SUNG H, KIM MN (2015). Further Modification of the Modified Hodge Test for Detecting Metallo- $\beta$ -Lactamase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Annals of Laboratory Medicine* **35** (3): 298-305.
- KUMARASAMY KK, TOLEMAN MA, WALSH TR, BAGARIA J, BUTT F, BALAKRISHNAN R, CHAUDHARY U, DOUMITH M, GISKE CG, IRFAN S, KRISHNAN P, KUMAR AV, MAHARJAN S, MUSHTAQ S, NOORIE T, PATERSON DL, PEARSON A, PERRY C, PIKE R, RAO B, RAY U, SARMA JB, SHARMA M, SHERIDAN E, THIRUNARAYAN MA, TURTON J, UPADHYAY S, WARNER M, WELFARE W, LIVERMORE DM, WOODFORD N (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* **10** (9): 597-602.
- LAHEY CLINIC WEB SAYFASI. Erişim adresi: [www.lahey.org/studies]. Erişim tarihi:14/07/2015.
- LAURETTI L, RICCIO ML, MAZZARIOL A, CORNAGLIA G, AMICOSANTE G, FONTANA R, ROSSOLINI GM (1999). Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43** (7): 1584-1590.
- LEE K, CHONG Y, SHIN HB, KIM YA, YONG D, YUM JH (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection* **7** (2): 88-91.
- LEE K, YUM JH, YONG D, LEE HM, KIM HD, DOCQUIER JD, ROSSOLINI GM, CHONG Y (2005). Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (11): 4485-4491.
- LEE K, KIM CK, YONG D, JEONG SH, YUM JH, SEO YH, DOCQUIER JD, CHONG Y (2010). Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *Journal of Microbiological Methods* **83** (2): 149-152.
- LEVAST M, POIREL L, CARRÈR A, DEIBER M, DECROISSETTE E, MALLAVAL FO, LECOMTE C, NORDMANN P (2011). Transfer of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Turkey to France. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (4): 944-945.
- LIVERMORE DM (2012). Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine* **27** (2): 128-142.

- LIVERMORE DM, ANDREWS JM, HAWKEY PM, HO PL, KENESS Y, DOI Y, PATERSON D, WOODFORD N (2012). Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly? *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67** (7): 1569-1577.
- MANDELL L (2009). Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection. *Clinical Infectious Diseases* **49** (Suppl. 1): S1-S3.
- MIMOZ O, GRÉGOIRE N, POIREL L, MARLIAT M, COUET W, NORDMANN P. (2012). Broad-spectrum  $\beta$ -lactam antibiotics for treating experimental peritonitis in mice due to *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (5): 2759-2760.
- MIRIAGOU V, TZELEPI E, DAIKOS GL, TASSIOS PT, TZOUVELEKIS LS (2005). Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **55** (5): 810-811.
- MIRIAGOU V, CORNAGLIA G, EDELSTEIN M, GALANI I, GISKE CG, GNIADKOWSKI M, MALAMOU-LADA E, MARTINEZ-MARTINEZ L, NAVARRO F, NORDMANN P, PEIXE L, POURNARAS S, ROSSOLINI GM, TSAKRIS A, VATOPOULOS A, CANTÓN R (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection* **16** (2): 112-122.
- MOQUET O, BOUCHIAT C, KINANA A, SECK A, AROUNA O, BERCION R, BREUREC S, GARIN B. (2011). Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*, Senegal. *Emerging Infectious Diseases* **17** (1): 143-144.
- MUNOZ-PRICE LS, POIREL L, BONOMO RA, SCHWABER MJ, DAIKOS G, CORMICAN M., CORNAGLIA G, GARAU J, GNIADKOWSKI M, HAYDEN MK, KUMARASAMY K, LIVERMORE DM, MAYA JJ, NORDMANN P, PATEL JB, PATERSON DL, PITOUT J, VILLEGAS MV, WANG H, WOODFORD N, QUINN JP (2013). Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *The Lancet Infectious Diseases* **13** (9): 785-796.
- NAZIC H, POIREL L, NORDMANN P (2005). Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (5): 2146-2147.
- NAZIK H, AYDIN S, ALBAYRAK R, BILGI EA, YILDIZ I, KUVAT N, KELESOGU FM, PAKASTICALI N, YILMAZ F, ONGEN B (2014). Detection and spread of Oxa-48-producing *Klebsiella oxytoca* isolates in Istanbul, Turkey. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* **45** (1): 123-129.
- NORDMANN P (2014). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. *Médecine et maladies infectieuses* **44** (2): 51-56.
- NORDMANN P, POIREL L (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection* **8** (6): 321-331
- NORDMANN P, NAAS T, POIREL L (2011a). Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* **17** (10): 1791-8.

- NORDMANN P, POIREL L, WALSH TR, LIVERMORE DM (2011b). The emerging NDM carbapenemases. *Trends in Microbiology* **19** (12): 588-595.
- NORDMANN P, CORNAGLIA G (2012a). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! *Clinical Microbiology and Infection* **18**: 411–412.
- NORDMANN P, GNIADKOWSKI M, GISKE CG, POIREL L, WOODFORD N, MIRIAGOU V (2012b). Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* **18** (5): 432-438.
- NORDMANN P, POIREL L, DORTET L (2012c). Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* **18** (9): 1503-1507.
- NORDMANN P, CAUARD JP, SANSOT D, POIREL L (2012d). Emergence of an Autochthonous and Community-Acquired NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clinical Infectious Diseases* **54** (1): 150-151.
- NORDMANN P, POIREL L (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (3): 487-489.
- NORDMANN P, POIREL L (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection* **20** (9): 821-830.
- OELSCHLAEGGERP, AI N, DUPREZ KT, WELSH WJ, TONEY JH (2010). Evolving Carbapenemases: Can Medicinal Chemists Advance One Step Ahead Of The Coming Storm? *Journal of Medicinal Chemistry* **53** (8): 3013–3027.
- O'HARA K, HARUTA S, SAWAI T, TSUNODA M, IYOBE S (1998). Novel metallo  $\beta$ -lactamase mediated by a *Shigella flexneri* plasmid. *FEMS Microbiology Letters* **162** (2): 201–206.
- OLIVER A, LEVIN BR, JUAN C, BAQUERO F, BLÁZQUEZ J. (2004). Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (11): 4226–4233.
- OSANO E, ARAKAWA Y, WACHAROTAYANKUN R, OHTA M, HORII T, ITO H, YOSHIMURA F, KATO N (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase- found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **38** (1): 71–78.
- PAPP-WALLACE KM, ENDIMIANI A, TARACILA MA., BONOMO RA (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55** (11): 4943–4960
- PASTERAN F, MENDEZ T, GUERRIERO L, RAPOPORT M, CORSO A (2009). Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology* **47** (6): 1631-1639.
- PERRY JD, NAQVI SH, MIRZA IA, ALIZAI SA, HUSSAIN A, GHIRARDI S, ORENGA S, WILKINSON K, WOODFORD N, ZHANG J, LIVERMORE DM, ABBASI SA,

- RASA MW (2011). Prevalance of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (10): 2288-2294.
- POIREL L, LE THOMAS I, NAAS T, KARIM A, NORDMANN P (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (3): 622-632.
- POIREL L, WELDHAGEN GF, NAAS T, DE CHAMPS C, DOVE MG, NORDMANN P (2001). GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45** (9): 2598-2603.
- POIREL L, HÉRITIER C, TOLUN V, NORDMANN P (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48** (1): 15-22.
- POIREL L, MARQUE S, HÉRITIER C, SEGONDS C, CHABANON G, NORDMANN P (2005). OXA-58, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49** (1): 202-208.
- POIREL L, NAAS T, NORDMANN P (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54** (1): 24-38.
- POIREL L, WALSH TR, CUVILLIER V, NORDMANN P (2011a). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **70** (1): 119-23.
- POIREL L, HERVÉ V, HOMBROUCK-ALET C, NORDMANN P (2011b). Long-term carriage of NDM-1-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (9): 2185-2186.
- POIREL L, POTRON A, NORDMANN P (2012a). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67** (7): 1597-1606.
- POIREL L, OZDAMAR M, OCAMPO-SOSA AA, TURKOGLU S, OZER UG, NORDMANN P (2012b). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56** (5): 2784-5.
- QUEENAN AM, BUSH K (2007). Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* **20** (3): 440-458.
- QUEENAN AM., SHANG W, FLAMM R, BUSH K (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of  $\beta$ -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 565-569.
- RASMUSSEN BA, BUSH K (1997). Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **41** (2): 223-232.
- RICCIO ML, FRANCESCHINI N, BOSCHI L, CARAVELLI B, CORNAGLIA G, FONTANA R, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM (2000). Characterization of the metallo- $\beta$ -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the

existence of blaIMP allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44** (5): 1229–35.

- RUPPÉ E, ARMAND-LEFÈVRE L, ESTELLAT C, CONSIGNY PH, EL MNIAI A, BOUSSADIA Y, GOUJON C, RALAIMAZAVA P, CAMPA P, GIRARD PM, WYPLOSZ B, VITTECOQ D, BOUCHARD O, LE LOUP G, PIALOUX G, PERRIER M, WIEDER I, MOUSSA N, ESPOSITO-FARÈSE M, HOFFMANN I, COIGNARD B, LUCET JC, ANDREMONT A, MATHERON S (2015). High Rate of Acquisition but Short Duration of Carriage of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae After Travel to the Tropics. *Clinical Infectious Diseases* pii: civ333.
- SEEMA K, RANJAN SEN M, UPADHYAY S, BHATTACHARJEE A (2011). Dissemination of the New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) among *Enterobacteriaceae* in a tertiary referral hospital in North India. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66** (7): 1646-1647.
- SEMIN-PELLETIER B, CAZET L, BOURIQAUULT C, JUVIN ME, BOUTOILLE D, RAFFI F, HOURMANT M, BLANCHO G, AGARD C, CONNAULT J, CORVEC S, CAILLON J, BATARD E, LEPELLETIER D (2015). Challenges of controlling a large outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French university hospital. *The Journal of Hospital Infection* **89** (4): 248-253.
- SOULI M, GALANI I, ANTONIADOU A, PAPADOMICHELAKIS E, POULAKOU G, PANAGEA T, VOURLI S, ARMAGANIDIS A, KANELLAKOPOULOU K, GIAMARELLOU H (2010). An outbreak of infection due to  $\beta$ -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical Infectious Diseases* **50** (3): 364–373.
- STEPHENS C, FRANCIS SJ, ABELL V, DIPERSIO JR, WELLS P (2007). Emergence of resistant *Acinetobacter baumannii* in critically ill patients within an acute care teaching hospital and a long-term acute care hospital. *American Journal of Infection Control* **35** (4): 212-215.
- STUART JC, LEVERSTEIN-VAN HALL MA; DUTCH WORKING PARTY ON THE DETECTION OF HIGHLY RESISTANT MICROORGANISMS (2010). Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36** (3): 205-210.
- STUART JC, VOETS G, SCHARRINGA J, FLUIT AC, LEVERSTEIN-VAN HALL MA (2012). Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with a commercial DNA microarray. *Journal of Medical Microbiology* **61** (Pt6): 809-812.
- TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV (1997). How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: A review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infection Control and Hospital Epidemiology* **18** (6): 426-439.
- TOLEMAN MA, SIMM AM, MURPHY TA, GALES AC, BIEDENBACH DJ, JONES RN, WALSH TR (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial

- surveillance programme. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50** (5): 673–679.
- TSAKRIS A, IKONOMIDIS A, POULOU A, SPANAKIS N, POURNARAS S, MARKOU F (2007). Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (1): 136-139.
- TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, TRECARICHI EM, TUMIETTO F, MARCHESE A, SPANU T, AMBRETTI S, GINOCCHIO F, CRISTINI F, LOSITO AR, TEDESCHI S, CAUDA R, BASSETTI M (2012). Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K.pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clinical Infectious Diseases* **55** (7): 943-950.
- TURNIDGE JD, GOTTLIEB T, MITCHELL DH, COOMBS GW, DALY DA, BELL JM; AUSTRALIAN GROUP ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE (2014). Community-onset Gram-negative Surveillance Program annual report, 2012. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report* **38** (1): E54-58.
- VATOPOULOS A (2008). High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: a review of the current evidence. *Euro Surveillance* **13** (4): pii:8023.
- VOULGARI E, ZARKOTOU O, RANELLOU K, KARAGEORGOPOULOS DE, VRIONI G, MAMALI V, THEMELI-DIGALAKI K, TSAKRIS A (2013). Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68** (1): 84-88.
- WALSH TR (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents* **36** (Suppl 3): S8-14.
- WALSH TR, TOLEMAN MA, POIREL L, NORDMANN P (2005). Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical Microbiology Reviews* **18** (2): 306-325.
- WALSH TR, WEEKS J, LIVERMORE DM, TOLEMAN MA (2011). Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *The Lancet Infectious Diseases* **11** (5): 355-362.
- WALTHER-RASMUSSEN J, HØIBY N (2007). Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60** (3): 470-482.
- WISE R (1986). In vitro and pharmacokinetic properties of the carbapenems. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **30** (3): 343–349.
- YANIK K, EMİR D, EROĞLU C, KARADAĞ A, GÜNEY AK, GÜNAYDIN M (2013). Karbapeneme Dirençli Gram-Negatif İzolatlarda New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz-1 (NDM-1) Varlığının PCR ile Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni* **47** (2): 382-284.
- YIGIT H, QUEENAN AM, ANDERSON GJ, DOMENECH-SANCHEZ A, BIDDLE JW, STEWARD CD, ALBERTI S, BUSH K, TENOVER FC (2001) Novel carbapenem-

hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **45 (4)**:1151-1161.

YILDIRIM I, CEYHAN M, GUR D, MUGNAIOLI C, ROSSOLINI GM. (2007). First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *Journal of Chemotherapy* **19 (4)**: 467-468.

YONG D, TOLEMAN MA, GISKE CG, CHO HS, SUNDMAN K, LEE K, WALSH TR (2009). Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53 (12)**: 5046-5054.

YU YS, DU XX, ZHOU ZH, CHEN YG, LI LJ (2006). First isolation of blaIMI-2 in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50 (4)**: 1610–1611.