



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM
DİRENÇLİ ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA
KARBAPENEM DİRENÇ GENLERİ VE GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) DİRENÇ
GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Harun Reşid SU

Antalya, 2017



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İNFEKSİYON HASTALIKLARI VE
KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM
DİRENÇLİ ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA
KARBAPENEM DİRENÇ GENLERİ VE GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) DİRENÇ
GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR)
YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASI**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Harun Reşid SU

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Özge TURHAN

“Kaynak gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

**Bu tez, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından TTU-2015-1204 proje numarası ile desteklenmiştir.**

Antalya, 2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince tez ve mesleki çalışmalarında bilgi ve deneyim kazanmamda, anlayış ve desteğini daima yanımda hissettiğim başta tez danışman hocam Sayın Prof.Dr. Özge TURHAN'a,

Akademik ve mesleki çalışmalarında karşılaştığım güçlükleri aşmamda bilgi ve tecrübesiyle şahsıma her fırsatta yardım eden motive edici sözleri ile eğitimime ve yaşamıma büyük katkılar sağlayan yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum hocam Sayın Prof.Dr. Latife MAMIKOĞLU'na,

Mesleki çalışmalarında bilgi, hoşgörü ve yardımseverlikleriyle eğitimim boyunca rehberliklerine başvurduğum Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıklar ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri Sayın Prof.Dr. Ata Nevzat YALÇIN'a, Sayın Prof.Dr. Filiz GÜNSEREN'e ve Sayın Prof.Dr. Dilara İNAN'a,

Çalışmam sırasında bu konuda deneyimlerini benimle paylaşan ve verdikleri desteklerle çalışmaya önemli katkı sağlayan Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyesi Sayın Prof.Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ'e ve Uzm. Dr. Cemile Aylin ERMAN DALOĞLU'na,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve hastane personellerine,

Uzun soluklu ve emek gerektiren bu eğitim sürecinde her zaman bana inanan, sevgi ve fedakârlıklarıyla manevi desteklerini hiç eksik etmeyen sevgili eşim, annem ve babama,

Saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Harun Reşid SU

Antalya, 2017

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	v
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	3
2.1.1. Morfoloji	3
2.1.2. Hücre yapısı	4
2.1.3. Kültür özellikleri	4
2.1.4. Biyokimyasal özellikleri	5
2.1.5. Antijenik yapı	5
2.1.6. Virulans ve patojenite özellikleri	6
2.1.7. Yaptığı hastalıklar	8
2.1.8. Bakteriyolojik tanı	9
2.1.9. Tıbbi önemi olan bazı cinsleri	10
2.2. β -laktam antibiyotikler	15
2.2.1. Karbapenemler	18
2.3. Bakterilerin antibiyotiklere karşı genel direnç mekanizmaları	21
2.3.1. β -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları	22
2.3.2. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde karbapenemlere direnç ve mekanizmaları	24
2.3.3. β -laktamazlar	25
2.3.4. Karbapenemazlar	29
2.3.5. Karbapenemaz aktivitesinin saptanması	33
2.3.6. Karbapenemaz epidermiyolojisi	43
2.3.7. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar	49
2.3.8. Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz aktivitesinin saptanması	51
2.3.9. Genişlemiş spektrumlu β -laktamazların epidermiyolojisi	55
3. GEREÇ VE YÖNTEM	57
3.1. Etik Kurul Onayı	57
3.2. Hastalar ve Örnekler	57

3.3. Bakteri Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Testi	57
3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	58
3.5. İstatistiksel Değerlendirme	65
4. BULGULAR	66
4.1. Bakteri türleri ve PCR Bulguları	67
4.2. Karbapenemaz üreten suşların yıllara göre prevalansı	71
4.3. Suşların Antibiyotik Duyarlılık Durumları ve Direnç Genlerine Göre Değerlendirilmesi	72
4.4. Klinik Özellikler ve Direnç Genlerinin Karşılaştırılması	75
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇLAR	91
7. ÖZET	93
8. ABSTRACT	95
9. KAYNAKLAR	97
10. EKLER	118
Ek 1. Olgu Takip Formu	

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMC	Amoksisilin-klavulanik asit
AMX	Amoksisilin
AN	Amikasin
AST	Antibiyotik duyarlılık testi
ATM	Aztreonam
BJG	Bush- Jacoby grubu
BJGM	Bush- Jacoby- Medeiros grubu
BLA	Beta laktamaz
CAZ	Seftazidim
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CİP	Ciprofloksasin
CFU	Koloni oluşturan ünite
CL	Kolistin
CLSI	Clinical Laboratory Standarts Institute
CPS	Sefaperazon/Sulbaktam
CRO	Seftriakson
CTX	Sefotaksim
CXM	Sefuroksim
CTX-M	Cefotaxime-hydrolyzing β -laktamase
CZ	Sefazolin
De	Değişken
DE	Dahi edilmemiştir
DHP 1	Dehidropeptidaz 1
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPA	Dipikolinik asit
E	Evet
EAEC	Enteroagregatif <i>E.coli</i>
EARS	European Antimicrobial Resistance Surveillance
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

EHEC	Enterohemorajik <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>E.coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EPEC	Enteropatojenik <i>E.coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>E.coli</i>
ETP	Ertapenem
EUCAST	ESCMID Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FEP	Sepefem
FOX	Sefoksitin
GES	Guiana extended spectrum
GIM	German imipenemase
GN	Gentamisin
GSS	Geniş spektrumlu sefalosporin
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
H	Hayır
I	Orta duyarlı
IMP	İmipenem
KA	Klavunat
KPC	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Karbapenemaz
LEV	Levofloksasin
log	Logaritma
LPS	Lipopolisakkarit
MBL	Metallo beta-laktamaz
MER	Meropenem
MHA	Müller Hinton Agar
MHT	Modifiye Hodge Testi
mL	Mililitre
MRSA	Metisiline dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MIK	Minimum inhibitör konsantrasyonu
MYSTIC	Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection
n	İzolat sayısı
N	Çalışılmamış

NDM	New Delphi Metallo beta-laktamaz
NHSN	National Healthcare Safety Network
NMC	Not metalloenzyme carbapenemase
OMP	Outer membran protein
OXA	Oxacillin
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PTA	Probability of target attainment
R	Dirençli
RNA	Ribonükleik Asit
S	Duyarlı
SHV	Sulfhydryl variable
SIM	Seoul imipenemase
SME	Serratia marcescens enzyme
TGC	Tigesiklin
TMP/SXT	Trimetoprim/Sulfametaksazol
TZB	Piperasilin/Tazobaktam
TEM 1	Temoniera-1
UHES	Ulusal Hastane Enfeksiyonları Surveyans Sistemi
VIM	Verona metallobetalaktamaz
β	Beta
μg	Mikrogram
μm	Mikrometre

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı	16
2.2. β -laktam halkasına göre antibiyotiklerin oluşumu	17
2.3. Farklı β -laktam grupların bisiklik çekirdeklerinin kimyasal yapıları	18
2.4. Karbapenemaz üreticilerinin saptanmasına yönelik algoritma	36
2.5. EUCAST'e göre inhibitör testlerinin yorumlanması ile ilgili akış şeması	39
2.6. KPC üreten suşların coğrafik dağılımı	43
2.7. IMP ve VIM üreten suşların coğrafik dağılımı	44
2.8. NDM üreten suşların coğrafik dağılımı	45
2.9. OXA-48 üreten suşların coğrafik dağılımı	46
2.10. Karbapenemaz üreten <i>Enterobacteriaceae</i> izolatları için Avrupa daki durum	47
2.11. E-test yöntemi ile GSBL tayini	53
2.12. GSBL'lerin fenotipik yöntemlerle saptanması için akış şeması	54
2.13. Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif <i>Enterobacteriaceae</i> taşıyıcı sayısı	56
3.1. BD MAX DNA reaktif şeridi	61
3.2. BD MAX Rack A ve Rack B	62
3.3. BD MAX PCR kartuşu	63

4.1.	BD MAZ CRE görüntüsü	70
4.2.	In-house GZ-PCR görüntüsü	71
5.1.	Çalışmamıza alınan izolatların sayısı ve dağılımı	83
5.2.	Çalışmamızdaki karbapenemaz üretimi tespit edilen <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinde enzim tiplerinin sayısı ve dağılımı	83



TABLOLAR DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesindeki bazı cins ve türler	7
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin biyokimyasal genel özellikleri	7
2.3. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin genel özellikleri	8
2.4. β -laktam grupları ve örnekler	17
2.5. Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması	19
2.6. Güncellenmiş β -laktamaz grupları ve genel özellikleri	28
2.7. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip β -laktamaz enzimler	30
2.8. EUCAST göre <i>Enterobacteriaceae</i> için karbapenem duyarlılık sınır ve tarama eşik değerleri	34
2.9. CLSI göre <i>Enterobacteriaceae</i> için karbapenem duyarlılık sınır ve tarama eşik değerleri	34
2.10. Karbapenemaz veya GSBL direnç mekanizması saptanmasının önemi	35
2.11. <i>Enterobacteriaceae</i> da karbapenemler için MIK değerlerinin dağılımı	35
2.12. GSBL pozitif veya negatif <i>Enterobacteriaceae</i> da direnç profilleri	36
2.13. Karbapenem dirençli mikroorganizmalarla kolonizasyon/infeksiyona yönelik bağımsız risk faktörleri	42
2.14. Karbapenemaz üreten <i>Enterobacteriaceae</i> , Avrupa ülkelerinde karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durum: 2014- 2015	47

2.15.	Türkiye de karbapenemaz üreten <i>Enterobacteriaceae</i>	48
2.16.	<i>Enterobacteriaceae</i> da GSBL tarama testleri için kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri, zon çapları ve MİK değerleri	52
3.1.	GZ-PCR protokolünde kullanılan primer ve prob dizileri	65
4.1.	Demografik özellikler	66
4.2.	2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen <i>Klebsiella spp.</i> türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı	67
4.3.	2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen <i>E. coli</i> türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı	68
4.4.	2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen <i>Enterobacteriaceae spp.</i> türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı	68
4.5.	<i>Enterobacteriaceae</i> türlerinde karbapenem direnç genleri ile CTX-M direnç geni varlığının türlere göre dağılımı	69
4.6.	<i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinde yıllara göre karbapenemaz geni saptanan suş sayısı ile prevalansı	72
4.7.	Suşlardaki Imipenem duyarlılık sonuçları	72
4.8.	Suşlardaki Ertapenem duyarlılık sonuçları	72
4.9.	Suşlardaki Meropenem duyarlılık sonuçları	72
4.10.	Çalışmaya alınan <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinde karbapenem direnç oranları	73
4.11.	OXA-48 direnç geni pozitif izolatların kültür öncesi antibiyotik duyarlılıkları	73
4.12.	BD MAX sistemi ile karbapenem direnç geni saptanan izolatların antibiyotik duyarlılık durumları (n/%).	74

- 5.1.** *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz genlerinin dağılımı **87**
ile ilgili son 5 yılda yapılan çalışmaların verileri
- 5.2.** Ülkemizde kan kültüründe üreyen *K. pneumoniae* ve *E. coli* **89**
suşlarında GSBL sıklığı ile ilgili son 10 yılda yapılan
araştırmaların sonuçları



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde, insanlardaki toplum ve hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların en önemli etkenleri *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunmaktadır. Bu ailede yer alan bakterilerin mevcut antibiyotiklerle tedavisi hala zordur. Tedavide en sık kullanılan β -laktam antibiyotiklere karşı dirençte temel mekanizma β -laktamaz enzim üretimidir. β -laktamaz enzimleri arasında yer alan genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) oksimino- β -laktamları hidroliz edebilen klavulanik asit ile inhibe olabilen enzimlerdir. GSBL üreten suşlarla oluşan ciddi enfeksiyonlarda karbapenemler tercih edilir. Bu nedenle karbapenem grubu antibiyotiklerin klinik kullanımda önemi giderek artmıştır (1).

Karbapenemler, β -laktam sınıfında hızlı bakterisidal etki gösteren, en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Karbapenem direnci, gram negatif bakterilerde, dış membran geçirgenliğinin azalması, effluks pompa sistemi veya β -laktamaz enzimlerle oluşmaktadır. Son 10 yıl içerisinde karbapenemlerin yaygın kullanılması karbapenemaz üreten izolatların yayılımını belirgin bir problem haline getirmiştir. Karbapenem direncinin öncelikle *Acinetobacter spp.* ve *Pseudomonas aeruginosa* da, sonrasında da *Enterobacteriaceae* ailesinde ortaya çıktığı görülmüştür (2). Başta *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere *Escherichia coli*, *Enterobacter species*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* gibi diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de görülmektedir (3).

Günümüzde β -laktamaz enzimleri için bilinen iki farklı sınıflandırma vardır. Bunlardan biri olan substrat hidrolizine dayanan fonksiyonel Bush sınıflamasında 4 major grup vardır, karbapenemazlar başlıca grup 2f'de yer alır. Diğer sınıflandırma ise aminoasit homolojisine dayanan moleküler Ambler sınıflamasıdır. Ambler sınıflamasına göre sınıf A,C ve D aktif bölgesinde serin, metallo- β -laktamaz (MBL) olarak bilinen sınıf B ise aktif bölgesinde çinko içerir. Bu sınıflamaya göre de karbapenemazlar sınıf A, B ve D'de yer alırlar (4).

Hastanede yatan hastalarda gelişen enfeksiyonlara (kan dolaşımı enfeksiyonları, ventilatör ilişkili pnömoniler, üriner sistem enfeksiyonları...) veya asemptomatik kolonizasyonlara neden olan *Enterobacteriaceae* suşlarında

karbapenemaz üretiminin hızla yaygınlaşması, olası salgınların önlenmesi amacıyla alınan enfeksiyon kontrolünde acil bir problem haline gelmiş ve bu suşların hızlı bir şekilde saptanması gerekliliği ortaya çıkmıştır (5).

Eğer bir bakteride herhangi bir karbapeneme karşı minimal inhibitör konsantrasyon (MIK) düzeyinin artması, disk difüzyon zon çapının azalması gibi duyarlılıkta azalma (az duyarlı /dirençli) durumu saptanır ise karbapenemaz varlığı açısından fenotipik veya genotipik olarak ileri bir inceleme gerekmektedir. Fenotipik yöntem olarak kullanılan Modifiye Hodge testinin zayıf karbapenemaz üreten bakterilerde yorumlama güçlüğü, yanlış pozitiflik, farklı karbapenemaz sınıflarının ayrımını yapamama gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bunun dışında doğrulama testi olarak Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit, Sınıf B MBL için de EDTA (Etilendiamin tetra asetik asit) ve dipikolinik asit (DPA) gibi inhibitör temelli özgül testler kullanılmaktadır (kombinasyon disk, çift disk sinerji testi gibi). Genotipik doğrulama için de günümüzde direk klinik örneklerden de çalışılabilen karbapenemaz direnç genini saptama amaçlı kullanılan PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) gibi moleküler yöntemler ve ticari kitleri bulunmaktadır (6).

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Hastanesi yataklı servisler ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan 2010-2015 yılları arasında alınan Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiş kan kültürlerinden izole edilen, otomatize sistem ile saptanmış ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenem direnç genlerini (KPC, OXA, NDM, IMP/VIM) ve genişlemiş spektrumlu β -laktamaz direnç geni (CTX-M) varlığını PCR yöntemi ile saptamak ve yıllara göre dağılımlarını incelemek amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 *Enterobacteriaceae*

Enterik bakteriler olarak da isimlendirilen *Enterobacteriaceae* ailesi tanımlanan kırktan fazla cins, yüzlerce tür ve alttürleri ile gram negatif basillerin en büyük ve heterojen topluluğudur. Doğada toprak, su ve bitkilerde bulunabilen enterik bakteriler insan ve hayvanların florasında da mevcuttur (7). Enfeksiyon hastalıkları ve klinik mikrobiyoloji disiplininin güncel ilgi alanını oluşturan ‘fırsatçı enfeksiyonlar’ ve ‘hastane enfeksiyonları’ etkenlerinin en önemlileri arasında yer almaktadırlar (8).

Salmonella typhi, *Yersinia pestis*, *Shigella* türleri gibi ailenin bazı üyeleri sadece insanda patojen iken, *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* gibi üyeleri kommensal floranın birer elemanı olarak fırsatçı enfeksiyonlara neden olurlar. Enterik bakteriler insanda bakteriyemiye, sepsisemiye, menenjitte, pnömoniye, tifoya, osteomyelite, cerrahi alan enfeksiyonlarına, idrar yolu enfeksiyonlarına ve intestinal enfeksiyonlar gibi birçok önemli hastalığa yol açabilirler (9).

Ailenin türleri antijenik yapılarına, biyokimyasal özelliklerine, ribonükleik asit (RNA)’lerinin 16S ribosomal-RNA dizilimlerine, deoksiribonükleik asit (DNA)’lerinin hibridizasyonuna göre sınıflandırılmışlardır (9).

2.1.1 Morfoloji

Enterik bakteriler gram negatif, sporsuz, boyutları 0,5-3 µm arasında değişen basillerdir. Hareketli olanlarda peritriş kirpik mevcuttur. Böylelikle kutupsal kirpiği olan *Vibrio* ve *Pseudomonas*’lardan ayrılırlar. *Y. pestis*, *Salmonella* cinsindeki bazı serovarlar ile *Klebsiella* ve *Shigella* cinsleri hareketsizdirler. *Yersinia pseudotuberculosis* ve *Yersinia enterocolitica* 25°C’de hareketli fakat 37°C’de hareketsizdirler. *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı cinslerinde belirgin bir kapsül veya slime tabakası mevcut iken bazı cinslerinde ise olmayabilir (8).

2.1.2 Hücre yapısı

Bakteriye şeklini veren sert, iç basınca karşı koruyan hücre duvarı içinde sitoplazmik zar ve sitoplazma bulunur. Sitoplazma içinde DNA, ribozomlar (70 S), RNA, enzimler, plasmid bulunur. Diğer prokaryotik hücrelerdeki gibi mitokondri, endoplazmik retikulum içermezler (10).

Enterik bakterilerin hücre yüzeyleri temel olarak dış zar, peptidoglikan tabaka ve sitoplazma zar yapılarından oluşmuştur. Dış zar protein, fosfolipit ve lipopolisakkarit (LPS) den meydana gelir. Hücre yüzeyinde ek olarak mukozal yüzeylere tutunmayı sağlayan pili, hareketi sağlayan flagellaları mevcuttur. Peptidoglikan, lipopolisakkarit ve fosfolipidler sitoplazma zarı tarafından sentezlenir. Lipid A, kor oligosakkarit ve tekrarlayan oligosakkarit yan zincirleri lipopolisakkarit tabakayı meydana getirir. Lipid A disakkarit yapıda olup endotoksin aktivitesinden sorumludur. Tekrarlayan oligosakkarit zincirler heterojen yapıda olup varlığı veya yokluğuna göre koloni şekli düzgün (S: smooth) ya da düzensizdir (R: rough). M ve K olmak üzere iki çeşit oligosakkarit bulunduran kapsüllü türler ise M (mukoid) koloni yaparlar. Bakteriyi kurumaya karşı koruyan M antijeni cinsler arasında ortak olup çapraz reaksiyona sebep olmaktadır. K oligosakkarit antijeni de serotipe özel olup bakteriyi fagositozdan korur. O antijeni ise aglütinasyonu engellediği için ısıtılarak bakteriden uzaklaştırılır (10).

2.1.3 Kültür özellikleri

Enterik bakteriler fakültatif anaeroptur. Optimal 35°-37°C de ve CO₂'siz ortamda ürerler. *Serratia* ve *Yersinia* gibi bazı türler daha düşük derecelerde de üreyebilir. Kolonileri 18- 24 saat sonra görünür hale gelir (9).

Laboratuarlarda enterik bakterilerin üretimi için selektif olmayan (kanlı ve çikolata agar) ve selektif besiyerleri (Mac Conkey agar gibi) kullanılır. Enterik bakteriler selektif olmayan besiyerlerinde büyük, gri, düzgün koloniler, selektif besiyerlerinde ise laktozu fermente edenler pembe- kırmızı, fermente etmeyenler, renksiz koloniler meydana getirirler. Hemolizin üreten *E. coli*'nin bazı suşları hariç enterik bakteriler kanlı agarda hemoliz yapmaz (9).

2.1.4 Biyokimyasal özellikleri

Glukozu fermente ettiklerinden dolayı fermentatif bakteriler olarak da isimlendirilen *Enterobacteriaceae* ailesi oksidaz negatif olup, nitratları nitritlere indirgerler fakat alginatı eritmezler (9).

Fermentatif bakterilerin identifikasyonunda kullanılan IMVIC testinde indol üretimi (İ), bakterinin glukoz fermentasyonu sonucu karışık asitler veya asetil metil karbinol oluşumunu ayırt eden metil kırmızısı reaksiyonu (M), voges-prokauer reaksiyonu (V) ve karbon kaynağı kullanımında sitrat tercih edilip-edilmediğini tespit eden reaksiyonundan (C) oluşan bir testtir. Fermentasyonda *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Serratia* cinsleri diğer fermentatif bakterilerden farklı olarak butanediol fermentasyonu yolunu kullanmaları sonucunda oluşan aseton yan ürünü sayesinde grubun Voges-Proskauer reaksiyonu pozitifdir. Örneğin *E. coli* 'nin IMVIC testi (++--) ve *Klebsiella spp* 'nin IMVIC testi ise (--++) dir (9).

2.1.5 Antijenik yapı

Enterik bakterilerde bazı türlerin (*Salmonella* ve *Shigella* gibi) antijenik yapısı, sınıflandırma ve epidemiyolojide rol oynar (8).

Somatik (O), kirpik (flagella) (H) ve kapsül (K) antijenleri serolojik tiplendirilmesinde kullanılan ana antijenlerdir. Ek olarak tüm enterik bakterilerin dış yüzeyinde bulunan *Enterobacteriaceae* Common Antijen (ECA) ortaktır (9).

Lipopolisakkarit yapısındaki O antijeni hücre dış duvarında yer alıp ısıya, alkole ve asitlere dayanıklıdır. Bazı bakterilerin kirpiklerinde bulunan flagellin isimli protein yapısındaki antijenlere H antijeni denir ve bu antijen hareketsiz bakterilerde bulunmaz. Kapsül antijenleri hücre duvar antijenlerini örterek aglütinasyonu engelleyebilir ve ısı ile fonksiyonu kaybedebilirler. Hareketsiz olan bakterilerde de bulunabilen önemli bir yüzey antijeni de fimbria antijenidir. Protein yapısında olup hemaglütinasyon oluşturma ve eritrosit dışındaki diğer hücrelere yapışabilme özelliğine sahiptir (8).

2.1.6 Virulans ve patojenite özellikleri

- **Adherans faktörler:** Enterik bakterilerin büyük bir kısmında bulunan ve mukozaya tutunmayı sağlayan yapılardır. Buna örnek olarak, çeşitli dış membran proteinleri, fimbriya ve pililer verilebilir (9).
- **Endotoksin:** Lipopolisakkaritin Lipid A bölümü toksik aktiviteye neden olur. Ek olarak makrofajlar, monositler ve diğer retiküloendotelial sistemi uyarak sitokinleri salgılatır. Salgılanan sitokinler sonucunda ateş, lökositoz/lökopeni, hipotansiyon, hipotermi, metabolik bozukluklar, dissemine intravaskular koagülasyon gibi sepsis ve septik şok kliniği oluşturabilir (9).
- **Enterotoksin:** İnce bağırsakları etkileyerek bağırsak lümenine bol sıvı atımına ve diyareye neden olan protein yapısında toksindir (9).
- **Shigatoksin ve Shigatoksin benzeri (Shiga-like) toksinler:** *Shigella dysenteria*, *Enteropatojenik Escherichia coli* ve bazı *Citrobacter* suşlarının oluşturduğu protein sentezini bozan enterotoksik ve nörotoksik etkileri bulunan protein yapısında toksinlerdir. Hemorajik diyareye yol açarlar (8).
- **Hemolizinler:** Nötrofillerin kemotaksisini ve fagositozunu önleyen, eritrositlere ve lenfositlere sitotoksik etki gösteren hücre dışına salınan ürünlerdir (9).
- **Sideroforlarla Demir Kazanımı:** Bakteriler konakta canlılığının devamı sağlamak ve dokulara yayılabilmek için geliştirdikleri çeşitli mekanizmalardan biri de siderofor denilen yapılardır. Bu yapılar sayesinde demir bağlama kapasitesitelerini arttırmaktadırlar (9).
- **Kapsül:** Bakterileri antikor ve lökositlere karşı koruyan, anti fagositik etki göstererek virülansa katkı sağlayan yapıdır. *S typhi*'nin Vi antijeni kapsül yapısı gibi virulanstan sorumlu bulunmuştur (9).
- **Bakteriyosin:** Bazı enterik bakterilerde protein yapısında üretilen bu maddeler (kolisin, pestisin) başka duyarlı bakterilerin yüzeyindeki özel reseptörlere bağlanarak bakterilerin ölümüne yol açar. Böylece üreme avantajı sağlar (9).

- **Plazmidler:** Bakteri hücresinde kendi kendine replike olabilen kromozom dışı DNA parçalarıdır. Gram negatiflerde antibiyotik direncine yol açan transpozonlar direnç plazmidleri üzerinde bulunurlar. Direnç plazmidleri diğer bakterilere konjugasyon ile aktarılabilmektedirler. Ek olarak kolonizasyon faktörleri, enterotoksin, hemolizin gibi virulans faktörlerini kodlayan genler de plazmidlerde bulunur (11).

Tablo 2.1. *Enterobacteriaceae* ailesindeki bazı cins ve türler (9):

Cins	Tür	Cins	Tür
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i> <i>aerogenes</i> <i>agglomerans</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>pneumoniae</i> <i>oxytoca</i> <i>granulomatis</i>
<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>freundii</i> <i>brakii</i>	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i> <i>vulgaris</i>
<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i> <i>flexneri</i> <i>sonnei</i> <i>boydii</i>	<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i> <i>typhi</i> <i>paratyphi</i> <i>typhimurium</i>
<i>Yersinia</i>	<i>enterocolitica</i> <i>pseudotuberculosis</i>	<i>Providencia</i>	<i>rettgeri</i> <i>stuarti</i>
<i>Serratia</i>	<i>marcescens</i>		

Tablo 2.2. *Enterobacteriaceae* ailesinin biyokimyasal özellikleri

	Glukoz	Laktoz	Sükroz	Gaz	H ₂ S	Ureaz	Indol	Metilen Kırmızısı	Voges proskauer	Sitrat
<i>E.coli</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Klebsiella</i> spp	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+
<i>Salmonella</i> spp	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Shigella</i> spp	+	-	-	-	-	-	+/-	+	-	-
<i>Proteus</i> spp	+	-	-	+/-	+	+	+/-	+	-	+/-

Tablo 2.3. *Enterobacteriaceae* ailesinin genel özellikleri (9):

- Gram negatif basillerdir.
- Sporsuzdurlar.
- Peritriş kamçıları ile hareketli veya hareketsiz olabilirler.
- Pepton veya etözlü besiyelerinde NaCl veya bir başka madde ilavesi olmadan üreyebilirler.
- Mac Conkey agarda iyi ürerler.
- Aerobik ya da anaerobik ortamlarda üreyebilirler.
- Glukozdan fermentasyonla asit oluştururlar.
- Katalaz pozitifler.
- Oksidaz negatiftirler.
- Nitratı, nitrite çevirirler.
- DNA da Guanin+Sitozin (G+C) oranı genelde % 39-59 arasındadır.
- *Erwinia* cinsi dışındaki enterik bakterilerde ortak ECA antijeni bulunur.

2.1.7 Yaptığı hastalıklar

2009-2010 National Healthcare Safety Network (NHSN) raporlarına göre *Enterobacteriaceae* ailesi nozokomiyal enfeksiyonlara en fazla neden olan etkenler arasında gösterilmektedir. Gram negatif nozokomiyal bakteriyel enfeksiyonlarda en çok izole edilen türler: *E. coli* (%11,5), *Klebsiella* spp. (%8), *Enterobacter* spp. (%4,7)'dir (12).

Bu geniş ailenin insanda yaptığı enfeksiyonlar şu şekilde özetlenebilir: *Salmonella* cinsindeki bakteriler tifoid, enterik, lokal ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilirler. *Shigella* cinsleri diğer enterik bakterilerden farklı olarak sadece bağırsakta enfeksiyona neden olur. Bağırsakta kommensal suşları daima bulunan *K. pneumoniae* ve *Escherichia* cinsleri idrar yolu enfeksiyonuna, pnömoniye, seröz zarlarda enfeksiyona, cerrahi alan enfeksiyonlarına, abseye, özellikle yeni doğanda sepsisemiye ve menenjit gibi çok çeşitli bağırsak dışı enfeksiyonlar ile ishal, kolit gibi enterik enfeksiyonlara yol açabilir. Böbrekte taş oluşumuna yol açabilen *Proteus* cinsindeki bakteriler çeşitli dokularda peritonit, ampiyem, sepsisemi, akciğer gangreni, idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurlar. *Yersinia*

cinsindeki *Y. pestis* çeşitli klinik tablolar oluşturabilen vebanın etkenidir. Ek olarak diğer *Yersinia* cinsleri mezenterik lenfadenite, bağırsak enfeksiyonlarına, Reiter sendromuna yol açabilir. Diğer potansiyel patojen *Enterobacter* spp. türleri özellikle hastane ortamında nozokomiyal enfeksiyonlarında izole edilebilir (9).

2.1.8 Bakteriyolojik tanı

Enterik bakterilerin etken oldukları enfeksiyonlar çok geniş bir spektrum gösterdiğinden bakteriyolojik tanı için incelenecek örnekler ve yöntemler de çeşitlidir (8).

Dışkının makroskopik incelenmesi ile kan, mukus varlığı, direkt mikroskopik incelemesi ile eritrosit, lökosit varlığı, kültürünün yapılması ile patojen bakteri belirlenebilir. Flora üyesi bakteriler arasından etken patojen mikroorganizmanın seçilmesi amacıyla yapılan boyalı preparatlar ise anlamsızdır. Fakat diğer klinik örneklerde mikroskopik inceleme kültür sonuçları ile birlikte değerlendirilmek üzere faydalı bulgular sağlar (8).

Bağırsak dışı enfeksiyonlarda ise yerleşim yerine göre uygun örneklerden, bakteriyemi ile seyreden enfeksiyonlarda kandan etken patojen bakteriler soyutlanabilir. *Enterobacteriaceae* ailesinden bir bakterinin etken olma olasılığı durumunda elde edilen klinik örneklerin kültürü için kanlı agar ve ayırt edici ve/veya seçici besiyerlerine ekim yapılmalıdır. Tanımlamada koloni morfolojileri, faj duyarlılıkları, antijen yapıları, seçici besi yerlerinde üremeleri, biyokimyasal özelliklerinden yararlanılır (8).

Moleküler yöntemler ile bakterilerin aile, cins, tür, serotip, köken düzeyinde tanımlamaları; patojen ve patojen olmayan kökenlerin ayrımı yapılabilir. DNA restriksiyon profillerinin belirlenmesi, plazmid profil analizi, DNA nükleotid dizilerinin tayini gibi yöntemler kullanılarak incelenen kökenler birbirleri ile ve referans bakteriler ile karşılaştırılabilir (8).

2.1.9 Tıbbi önemi olan bazı cinsleri

I. *Escherichia*

Escherichia cinsinde tıbbi önemi olan *E.coli*, bağırsak florasında en yaygın bulunan fakültatif anaerob türdür. *E.coli* insan yaşamının ilk saatlerinde sindirim sisteminde kolonize olur, daha sonra mutual bir yaşam sürer (8). Diğer enterik bakterilerin aksine doğada bulunmazlar. Bu nedenle, su ve besin maddeleri gibi çevreden alınan örneklerde *E.coli*'nin izole edilmesi maddelerin dışkı ile kontaminasyonunu gösteren bir işarettir. *E.coli* toplum kaynaklı ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı bir patojendir (10).

E.coli 1-1,5 µm eninde, 2-6 µm boyunda gram negatif basillerdir. Granül içermez ve homojen boyanırlar. Mikroskopta kapsül oluşumu nadirdir. Birçok suşunda polisakkarit antijenik yapılar olan mikrokapsül ve/veya slime tabakası bulunabilir (8). Suşlarında çoğunlukla fimbria bulunur ve peritriş kirpikleri ile hareketlidirler (10).

E.coli genel üretim besiyerlerinde rahatlıkla ürer. Basit besiyerlerinde 18-24 saatte 3-4 mm çapında S tipi koloni, kapsüllü olanlar M tipi koloni yaparlar. Kanlı agarda bazı suşları β- hemoliz yaparlar. Mac Conkey agarda, etrafında safra tuzlarının oluşturduğu pembe alanlarla çevrili laktoz pozitif koloniler şeklinde gözlenirler (10).

E.coli suşları glukoz ve diğer karbonhidratlara etki ederek asit ve gaz oluştururlar. İndol, metil-red testi ve hareket testi pozitif iken, Voges-Prauskaue reaksiyonu, sitrat kullanımı, H₂S oluşumu ve üre hidrolizi negatiftir (7).

E.coli suşları O, H ve K antijenlerine göre tiplendirilirler ve suşları arasında serolojik olarak farklı çok sayıda O, H, K antijenleri mevcuttur (8).

E.coli'nin majör virölans faktörleri kapsül, enterotoksin ve salgıladığı enzimlerdir. Konak hücrelerine fimbriyalar ile tutunurlar. Bazıları hemolizin salgılar. Sideroforlar ise bir diğer virölans faktörüdür (13).

E.coli'nin neden olduğu enfeksiyonların çoğu endojen kaynaklı olmasına karşın gastroenterit oluşturan suşları ekzojen kaynaklıdır. Gastroenterit yapan *E.coli* suşları 5 büyük gruba incelenir: Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), Enteroagregatif *E.coli* (EAEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC)'dir. Bunlardan ETEC, EPEC, EAEC ince barsağı etkileyerek sekretuvar diyare yaparken, EHEC ve EIEC primer olarak kalın barsağı etkilemektedir (14).

- **ETEC:** Bu patojenler insana kontamine su ve besinlerle fekal-oral bulaşır. Bu enfeksiyon gelişmemiş ülkelerde, gelişmiş ülkelere seyahat eden kişilerde görülür. Bu yüzden turist diyaresi olarak da bilinir. Kramplar ile birlikte sulu bir dışkılama olur. Dışkıda kan ve mukus bulunmaz, kusma ve ateş görülmez. Genelde 4-5 gün içinde hastalık kendini sınırlar (10).

- **EPEC:** Bu patojenler insana kontamine su ve besinlerle fekal-oral bulaşır. EPEC suşları ile gelişen sulu diyarede kusma ile birlikte ishal görülür. Ateş çok yükselmez veya hiç yoktur. Dışkıda kan ve mukus nadir görülmektedir. Genelde bir hafta içinde kendini sınırlamaktadır. EPEC suşları toksin oluşturmaz ve invaziv özellik göstermezler (10).

- **EHEC:** Bu patojenler insanlara kontamine et içeren besin maddeleri (hamburger eti, salam, süt...) ile bulaşır. Kalın bağırsaklara yapışan EHEC ürettiği bir ekzotoksin ile mukozal invazyon ya da inflamasyon olmaksızın ağır, kanlı diyareye neden olur. Komplikasyon olmadığı durumda kendini bir hafta içerisinde sınırlar. *S. dysenteriae* tip I'in oluşturduğu toksin ile benzerlik gösterdiği için Shiga benzeri toksin veya diğer adıyla verotoksin oluşturan *E.coli* suşları olarak da bilinirler (10).

- **EAEC:** Gelişmekte olan ülkelere ve bu ülkelere seyahat edenlerde persistan diyare etkeni olarak infantlarda dehidratasyona yol açması ile bilinir. Kronik diyare etkeni olup, küçük çocuklarda büyüme geriliğine neden olan birkaç bakteriden birisidir. Yüzeylerinde adheranstan sorumlu çok ince fibriler yapılar sayesinde üreme esnasında bakterilerin kümeler oluşturmaya neden olur. Bu yüzden agregatif ismini almıştır (14).

• **EIEC:** Bu patojenler insana en çok kontamine besinler yolu ile bulaşır. Çoğunlukla sulu ishallere neden olur (10).

II. *Klebsiella*

İnsanda deri, üst solunum yollarında ve bağırsakta kommensal olarak bulunur. Hastanede yatan hastalarda antibiyotik kullanımına bağlı olarak hem kolonizasyon oranı hem de bakteri sayısı artar. Çoklu ilaç direncine sahip olması, kuruluğa ve çevre koşullarına dayanıklı olması nedeniyle hastane ortamında kolaylıkla yayılabilmektedir. Hastane ortamında özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda kolonize olarak endojen veya ekzojen kaynaklı enfeksiyonlara yol açar. Bakteriyemi, sepsis, lobar pnömoni, idrar yolu ve çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlarda etkindir. Fimbria bulanan üç patojen suş mevcuttur: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *K. granulomatis*'dir (8).

Klebsiella türleri 0,7-1,5 µm eninde, 2-5 µm boyunda gram negatif, kapsüllü, hareketsiz bir bakterilerdir. Kirpikleri yoktur. Fakültatif anaeroblardır. Optimal 37°C de ürerler. Basit besiyerlerinde 18-24 saatte S tipi koloni, kapsüllü olanlar M tipinde koloni oluştururlar (7).

K.pneumoniae üreyi hidrolize eder. Metil kırmızısı reaksiyonu negatif, Voges-Prauskaue reaksiyonu ise pozitifdir. Sitrata tek karbon kaynağı olarak kullanılabilir. *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'nın ayırımında kullanılan indol testi, *K. pneumoniae*'de negatif, *K. oxytoca*'da ise pozitifdir. H₂S üretmezler (7).

Klebsiella cinsindeki O antijenleri endotoksini oluşturur. Belirgin bir kapsüle sahip olan *Klebsiella* cinsinde en önemli anijenik yapı K antijenleridir. K antijenine göre serotiplendirmeleri yapılmaktadır. K antijenleri fagositozu ve enfeksiyon bölgesine fagositlerin göçünü engelleyen virülans faktörleridir (9). Bazı suşlar plazmidde kodlanmış olan enterotoksin salgılar. Bu toksin *E.coli*'nin ısıya dayanıklı stabil toksini ve ısıya duyarlı labil toksini ile benzerlik gösterir (10).

III. *Enterobacter*

Enterobacter cinsi son yıllarda özellikle hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bir bakteri türü olarak karşımıza çıkmaktadır. *Enterobacter* türleri toprakta, suda, bitkilerde, süt ürünlerinde ve ayrıca insan ve hayvanların kalın barsağında bulunmaktadır. *Enterobacter* cinsinde bulunan türler içinde insanlarda enfeksiyona yol açan türler *E. aerogenes* ve *E. cloacae*'dir (15).

Besiyerlerinde kolay ürerler. Laktoz içeren besiyerlerinde ortası koyu olan, pembe renkli, hafif mukoid koloniler oluştururlar (15).

Enterobacter cinsleri genelde kapsülsüz, peritriş kirpikleri ile hareketlidirler. Başta glukoz olmak üzere şekerleri asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. İndol ve metil red testi negatifken, Voges Proskauer testi ise çoğunda pozitifdir. H₂S üretmezler. *E. cloacae* ısıya dirençli enterotoksin üretebilir (15).

Bakteriyemi, sepsisemi, alt solunum yolu enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, karın içi enfeksiyonları, septik artrit, osteomyelit ve göz enfeksiyonlarını da kapsayan çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu nozokomiyal patojenlerdir (16). Bakteriyemi için en önemli risk faktörü altta yatan ciddi bir hastalığının olmasıdır. Bu konuda yapılan çalışmalarda tüm araştırmacılar önceden antibiyotik kullanımının bakteriyemiye eğilim yaratan bir etmen olduğunu ortaya koymuşlardır. Bu antibiyotikler örnek olarak β -laktam grubu ve aminoglikozitler verilmiştir (8).

IV. *Morganella*

Bu cinsin tek türü *Morganella morganii* dir. Fırsatçı patojen olarak idrar yolu enfeksiyonlar ve çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlara yol açabilir (8).

Hareketli, fakültatif anaerobdur. İndol ve metilen kırmızısı pozitif, Voges-Prauskauer reaksiyonu negatiftir. Sitratı kullanmazlar (8).

O ve H antijenlerine göre serovarlara ayrılır (8).

V. *Serratia*

Doğada yaygın olarak sulara, bitkilerde, mantarlarda ve yosunlarda, insan ve hayvanların florasında bulunurlar. Bu cinsin temsilcisi *S. marcescens* dir (8).

0,5-0,8 µm eninde 0,9-2,0 µm boyunda, peritriş kirpikleri ile hareketli, kapsülsüz, kırmızı renkli koloniler oluşturan gram negatif kokobasillerdir (8).

İndol ve metil-red testi negatif iken, Voges-Prauskauer reaksiyonu ve sitrat kullanımı pozitifdir. Laktoz negatifdir (7).

Marcescin adı verilen bakteriyosin ile O ve H antijenleri bulunur (8).

Özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde hastane enfeksiyonlarına, bakteriyemilere, sepsisemilere yol açarlar. *Enterobacter*, *Serratia* ve indol pozitif *Proteus* gibi mikroorganizmalar indüklenebilir β-laktamaz ürettiklerinden dolayı tedavide sorun yaşanmaktadır (8).

VI. *Proteus*

Enterobacteriaceae ailesinin *Proteeae* kabilesinde *Proteus*, *Morganella* ve *Providencia* türleri bulunur. *Proteus* cinsi suda, toprakta ve dışkıda bulunur. İnsanlar için patojen olan türler *Proteus mirabilis* ve *Proteus vulgaris* tir (17).

Peritriş kirpikleri ile hareketli, kapsülsüz, laktoza etki etmeyen, besiyerinde yüzeye dalgalar oluşturarak yayılan (swarming) koloniler oluşturan gram negatif kokobasillerdir. Ek olarak kültürleri lağım gibi kokar. Üre pozitif, nitrat pozitifdirler. H₂S üretirler. Metil-red testi pozitif, Voges-Prauskauer reaksiyonu negatiftir (3).

O ve H antijenlerine göre serovarlara ayrılırlar. *P. vulgaris* ile *Rickettsia* lar ortak antijenik yapıya sahiptir (8).

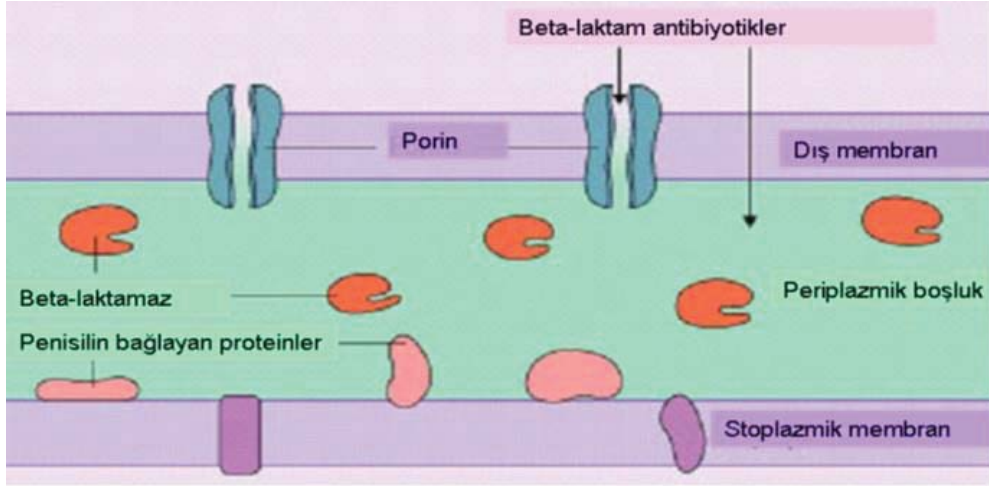
P. mirabilis sağlıklı insanda kolonize olabilirken, *P. vulgaris* ve *Proteus penneri* de sıklıkla ek hastalıkları olan bireylerde kolonize olur. İnsanlarda sıklıkla idrar yolu enfeksiyonlarına ve cerrahi alan enfeksiyonlarına neden olur (17).

VII. *Citrobacter*

İnsan dışkıında flora elemanı olarak bulunan bu bakteri fırsatçı enfeksiyonlara yol açar. Hareketli, oksidaz negatif, katalaz pozitif gram negatif bakteridir. Biyokimyasal olarak İndol negatif, sitrat pozitifdir. Türlerin ayırımında kullanılan H₂S *Citrobacter freundii* de pozitifdir (8).

2.2 β-Laktam Antibiyotikler

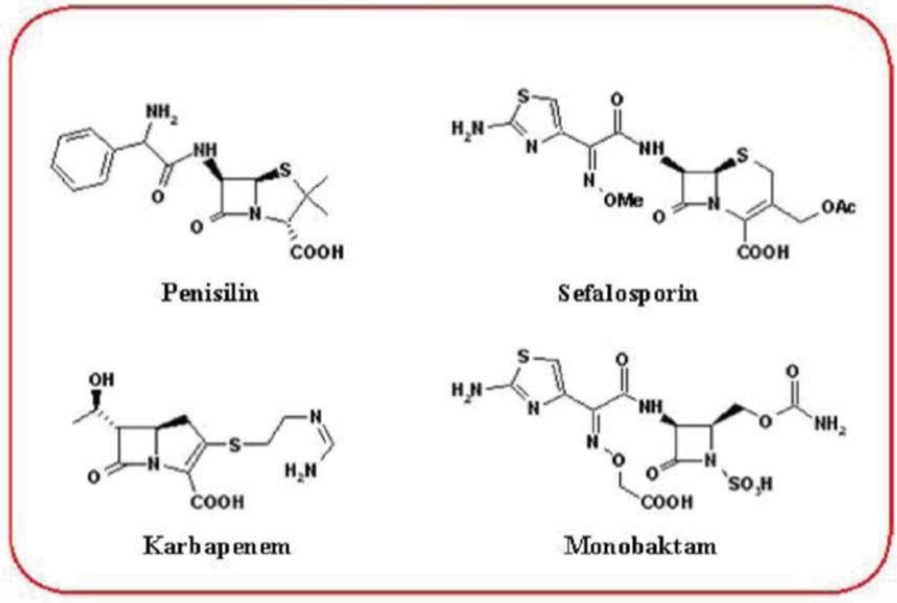
β-laktam antibiyotikler, geniş etki spektrumları ve güvenli olmalarıyla dünyada en yaygın olarak kullanılan antibakteriyel ajanlardır. Bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan (müreın) tabaka sayesinde mikroorganizmaların yapı ve bütünlükleri sağlanır. Peptidoglikan tabaka, N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin D-alanin molekülünün transpeptidasyon reaksiyonu ile oluşan çapraz bağlanan peptid zincirleri ile sağlamlaşır. Transpeptidaz tepkimesini gerçekleştiren enzimlere penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) denir. β-laktamlar, uzaydaki dizilimleri ve yapısı D-alanin D-alanin molekülüne çok benzediğinden dolayı bu molekülün yerini alarak PBP ile tepkimeye girer ve transpeptidasyon basamağının oluşmasını önler (18). Sonuçta hücre duvar yapısı bozulan bakteride ozmotik direnç kaybı ve ölüm gerçekleşir (19). β-laktamlar hedeflerine ulaşp etkinlik göstermeleri için Outer Membran Protein (OMP) ismi verilen içi su dolu protein kanalcıklarından (porin) geçip, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan β-laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir (20).



Şekil 2.1. Gram negatif bakteri hücre duvar yapısı (21).

β -laktam antibiyotikler yapılarında bir azot ve üç karbondan oluşan dört üyeli β -laktam halkası içerirler. Monobaktamlar hariç aldıkları ek halkalarla ile ayrılırlar (penisilinlerde thiazolidin halkası, sefalosporinlerde sefam çekirdeği, karbapenemlerde çift halka yapısı) (8).

1. β -laktam halkası ve beş üyeli yan zincir içerenler
 - a. Penisilin, Sulbaktam, Tazobaktam
 - b. Klavam: Klavulanik asit
 - c. Karbapenemler
2. β -laktam halkası ve altı üyeli yan zincir içerenler
 - a. Sefem: Sefalosporinler, Sefamisinler
 - b. Oksasefem: Moksalaktam
 - c. Karbasefem: Lorakarbef
3. Tek bir β -laktam halkası içerenler
 - a. Monobaktam: Aztreonam
 - b. Araştırılanlar: Monokarbam, Monosulfaktam



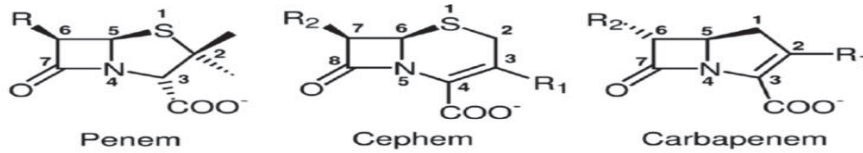
Şekil 2.2. β -laktam halkasına göre antibiyotiklerin oluşumu (22).

Tablo 2.4. β -laktam grupları ve örnekler(20).

β -laktamlar	Antimikrobial ajanlara örnekler
Penisilinler	Doğal Penisilinler: Penisilin G, Penisilin V, Penisilinaza Dirençli Penisilinler: Metisilin, Nafsilin, Oksasilin, Kloksasilin, Temosilin Aminopenisilinler: Amoksisilin, Ampisilin ve esterleri Karboksipenisilinler: Karbenisilin, Tikarsilin Üreidopenisilinler: Mezlosilin, Piperasilin, Azlosilin
β -laktamaz inhibitörleri	Sulbaktam, Tazobaktam, Klavunat
Sefalosporinler	1.Kuşak Grubu: Sefazolin, Sefalotin, Sefaleksim 2.Kuşak Grubu: Gerçek Sefalosporinler (Sefuroksim, Sefaklor, Sefamandol), Sefamisinler (Sefoksitin, Sefotetan) 3.Kuşak Grubu: Sefiksım, Sefdinir, Sefotaksim, Seftriakson, Sefpodoksım, Sefoperazon, Seftezidim 4.Kuşak Grubu: Sefepim, Sefpirom 5.Kuşak Grubu: Sefetobiprol, Seftarolin
Karbapenemler	İmipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem.
Monobaktamlar	Aztreonam

2.2.1 Karbapenemler

1976 da *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin türevleridir. Temel yapısı penisilinin β -laktam halkasına benzemektedir. Fakat bu yapıda 1. pozisyon'daki sülfür yerine karbon, beş üyeli halkasındaki 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağlar bulunmaktadır. Karbapenemlerin pek çok β -laktamaza dayanıklılığı, yan zincirindeki farklı trans konfigürasyonundan oluşmaktadır. Bu yapı tüm karbapenemlerde ortaktır (23). Penem çekirdeği, penisilinlerde yer alır ve β -laktam halkasıyla birleşmiş bir tetrahidrotiazol halkası içerir. Sefem çekirdeği, sefalosporinlerde yer alır ve β -laktam halkasıyla birleşmiş bir dihidrotiazin halkası içerir. Karbapenem çekirdeği ise β -laktam halkasıyla birleşmiş bir dihidrotirol halkası içerir (24).



Şekil 2.3. Farklı β -laktam grupların bisiklik çekirdeklerinin kimyasal yapıları (24)

Karbapenemler bakterilerin hücre duvarından kolaylıkla diffüze olamamaktadırlar. Gram negatiflerin içine dış membran proteinleri aracılığıyla girmektedirler. Periplazmik alana geldikten sonra da PBP lere irreversibl olarak açilleyerek antibakteriyel etki gösterirler. Karbapenemlerin avantajlarından biri de aynı anda birden fazla ve farklı PBP lere bağlanabilmeleridir (25).

Gram pozitiflerden; hemolitik streptokoklar, penisilin duyarlı ve bazı penisilin dirençli *Streptococcus pneumoniae* suşları ile metisilin duyarlı stafilokoklara etkilidir. Penisilin duyarlı *Enterococcus faecalis* suşlarına bakteriyostatik etkilidir. Penisilin dirençli *Enterococcus spp.* ve *Enterococcus faecium* suşlarına ise etkisizdir. İmipenemin, gram pozitiflere karşı etkinliği meropenemden daha iyidir. Karbapenemler, gram negatiflerden *Enterobacteriaceae* ailesi, *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* suşlarına ayrıca β -laktamaz yapan *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonore* suşlarına karşı etkilidir. Meropenemin ise gram negatiflere etkinliği imipenemden iyidir. Metisilin dirençli stafilokoklar, *Burkoldheria cepacia*, *Stenotrophomonas*

maltophilia, *Chlamydia* ve *Mycoplasma* karbapenemlerin etki spektrumu dışındadırlar (23).

Karbapenemler plazmid ve kromozom kökenli çoğu β -laktamazlara dayanıklıdırlar. Ancak MBL ve serin karbapenemazlar tarafından hidrolize edilirler (26).

Tablo 2.5. Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması (2)

Grup 1	Grup 2	Grup 3
Ertapenem, Panipenem	İmipenem, Meropenem, Biapenem, Doripenem	CS-023

Birinci grup karbapenemler özellikle toplum kaynaklı enfeksiyonlarda, ikinci grup karbapenemler ise fermentatif ve nonfermantatiflere güçlü etkinlikleri nedeniyle hastane enfeksiyonları, febril nütropeni, sepsis, menenjit gibi hastalıkların sağaltımında tercih edilir. Üçüncü grup karbapenem olan CS-023 ise ikinci grubun etki spektrumuna ek olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı da etkisi mevcuttur (2).

I. İmipenem

En geniş spektrumlu β -laktamdır. Gram negatif ve pozitif tüm aerobik-anaerobik bakterilere karşı çok geniş bir etkinlik kapsamı vardır. Farklı antibiyoterapi kombinasyonlarıyla karşılaştırıldığında, çeşitli ciddi enfeksiyonların sağaltımında son derece etkin bir monoterapötik ajandır (23). Klinik kullanıma giren ilk karbapenem türevi antibiyotiktir. Bakteri çeperindeki PBP-1 ve PBP-2'lere yüksek afinite gösterir (27).

İmipenem, renal tübüllerde bulunan dehidropeptidaz-1 (DHP-1) adlı bir enzim tarafından hidrolize uğratılmaktadır. Bu sebepten DHP-1 inhibitörü olan silastatinle birlikte verilir (23).

İmipenemin plazma yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir. Kombine durumda enjekte edildiğinde yaklaşık 3/4 'ü değişmeden böbreklerden itrah edilir. Günlük erişkin imipenem dozu 1.5-4.0 gramdır; i.v. infüzyonla üçe veya dörde bölünerek 8 veya 6 saatte bir verilir (27).

En sık yan etkileri enjeksiyon yerinde ağrı, flebit ve tromboflebittir. Gastrointestinal sistemle ilişkili olarak bulantı, kusma, oral mukozitler ve ishal olabilmektedir. Ciddi yan etkiler nadirdir. β -laktam alerjisi olan hastalar imipeneme de alerjik olabilir. İmipenem kullanımında çeşitli alerjik reaksiyonlar (kaşıntı, deri döküntüsü, solunum sıkıntısı) görülebilmektedir. Nörotoksisite (konfüzyon, huzursuzluk, konvülziyon, tremor) oluşabilir. Özellikle altta yatan santral sinir sistemi hastalığı veya renal yetersizliği olan ve doz ayarlaması yapılmamış hastalarda konvülziyon ciddi bir yan etki teşkil eder (27). Karbapenemlerin nörotoksitesi C-2 yan zincirle ilişkilidir. Bu bakımdan en yüksek nörotoksisite imipenemde gözlenmektedir (23).

II. Ertapenem

2001 de erişkinler için lisans almıştır. Diğer karbapenemler gibi gram pozitif ve negatif bakterilere karşı aktivitesi vardır (28).

DHP-I inaktivasyonuna karşı meropenem gibi imipenemden daha dayanıklıdır bu nedenle silastatin gibi bir DHP-I inhibitörü ile birlikte verilmesi gerekmez. Ertapenem β -laktamazlara karşı diğer karbapenemlere göre daha az dayanıklıdır. Buna rağmen GSBL veya AmpC β -laktamaz dirençli patojenlerin çoğuna karşı MİK değerleri halen hassas sınırlar içerisinde. Ertapenemi diğer karbapenemlerden ayıran en önemli yapısal özellik dış membranında benzoik asid yerine meta grubunun yer almasıdır. Bu sebeple molekülün plazma proteinlerine bağlanma kapasitesi artar. Ertapenemin proteine bağlanma kapasitesi oranı % 95, imipenemin % 20'dir. Ertapenem in yüksek oranda protein bağlanma kapasitesi sonucunda plazma yarılanma zamanı uzar. Büyük çoğunlukla böbreklerden atılır ve eliminasyon yarılanma ömrü imipenem ve meropeneme göre uzundur. Bu sebeple günde tek doz (1 gr/gün) tedavi rejimi uygulama imkanı verir (28).

Ertapenem *P. aeruginosa*, diğer nonfermantatif gram negatif bakteriler, MRSA, *S. maltophilia* ve *Enterococcus* spp. ye karşı etkisizdir (29).

Serebrospinal sıvıya iyi penetre olmasına rağmen bakteriel menenjit tedavisine onay almamıştır. En sık görülen yan etkileri, ishal, flebit, tromboflebit ve karaciğer enzim yüksekliğidir (28).

III. Meropenem

İmipenemden farklı olarak DHP-1 enzimine karşı dayanıklı olduğu için tek başına parenteral kullanılır. İmipeneme göre etki süresi daha uzundur. Antibakteriyel spektrumu imipeneme benzerdir. İmipenem'e kıyasla direnç gelişimi daha güç olur. Günlük erişkin dozu 1,5-6 gramdır; i.v. infüzyonla üçe bölünerek 8 saatte bir verilir. İmipeneme göre daha az yan etkisi vardır. Bulantıya neden olmadığı için intravenöz bolus şeklinde verilebilir. Konvülziyon yapma etkisi imipeneme göre daha düşüktür. Bu nedenle renal yetmezliği veya santral nörolojik sorunlu hastalarda tercih edilir (27).

IV. Doripenem

DHP-1'e karşı dayanıklıdır. Gram pozitif bakterilere karşı imipenem, gram negatif bakterilere de meropenem kadar etkinliği vardır. Günlük erişkin dozu 1,5 gramdır; i.v. infüzyonla üçe bölünerek 8 saatte bir verilir (28). Doripenemde karbapenemazlarla hidroliz, imipeneme göre 2 ile 150 kat daha yavaştır (30).

İyi tolere edilir. En sık görülen yan etkileri baş ağrısı, enjeksiyon yerinde eritem, bulantı, ishal ve karaciğer enzimlerinin yüksekliğidir (28).

2.3. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Genel Direnç Mekanizmaları

I. Doğal Direnç: Bakterinin genetik özelliğidir. Bakteri ilacın hedef olan bölgesini taşımaz veya ilaç yapısal özelliğinden dolayı hedef bölgesine ulaşamaması sonucu olur (31).

II. Çevresel Direnç: Antibiyotiğin *invivo* ve *invitro* etkinliği arasındaki farkı gösterir. Yani antibiyotik laboratuvarda *invitro* etkinliği mevcut iken, dokuda oksijen basıncı, pH daki değişiklikler veya enfeksiyon bölgesinde ulaşmada sorun olduğu durumlarda *invivo* etkinliği olmaması durumudur (31).

III. Kazanılmış Direnç: Bakterilerin eskiden duyarlı olduğu antibiyotiklere genetik özelliklerindeki değişimler sonucu etkilenmemesi durumudur (31).

- i. **Kromozoma Bağlı Direnç:** Bakteri hücresinin metabolik ara ürünleri veya çevresel faktörler neticesinde bakteri kromozomunda oluşan spontan mutasyonlar ile ortaya çıkmaktadır. Hücrede yapısal değişiklikler olabilir, hücrelerin ilaca geçirgenlikleri azalabilir veya hücre içindeki ilacın hedefinde değişiklik oluşabilir (31).
- ii. **Plazmidlere Bağlı Direnç:** “R plazmid” olarak isimlendirilen genetik parçalar çeşitli antibiyotiklere karşı direnç genlerini ihtiva etmektedirler. Bu genetik direnç parçaları ihtiva eden izolatlar konjugasyon ile direnç genlerini duyarlı bakterilere ileterek onların da dirençli olmasına yol açmaktadır. Bu direnç daha çok antibiyotikleri inaktive eden veya hücrenin geçirgenliğini değiştiren enzimlerle olmaktadır (31).
- iii. **Transpozonlara Bağlı Direnç:** Bir DNA molekülünden diğerine geçebilen DNA dizilerine transpozonlar denir. Bağımsız olarak çoğalamadıklarından kromozom veya plazmid içinde bulunmakta ve bunların arasında yer değiştirebilmektedirler (31).

2.3.1. β -Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

β -laktamlar etki gösterebilmeleri için dış zar ve periplazmik aralıktan geçmeli, PBP'lere ulaşmalı ve etkin konsantrasyonda bağlanması gerekir. Bakteriyel izolatlar bu basamakların herhangi birinde engel oluşturarak direnç gösterebilirler (31).

1-) Kromozomal genlerde mutasyon oluşması: Direnç mutasyonları bakterideki düzenleyici genlerde de oluşabilmektedir. *Enterobacter spp.*'de kromozomal AmpC β -laktamaz üretiminin artışı (derepresyon), *P. aeruginosa*'da OmpD porininin yapımının azalması ile imipeneme direnç oluşması ve atım pompalarının etkisi bu tip dirence örneklerdir. Mutasyon ile oluşan direncin kalıcı olması, bakterinin buna ne kadar dayanabildiğine bağlıdır. Örneğin, OmpD porininin ifadesinin azalması çabuk gelişebilmesine karşı yaygın bir direnç mekanizması değildir. Büyük olasılıkla bu porin, bakteri için yaşamsal olduğundan imipenem olmadığında bakteri bu porinleri tekrar yapmaktadır.

Direnç kazanmanın bakteriye zararlı olan etkileri “fitness cost” (dayanıklılığın bedeli) olarak tanımlanmaktadır. Buna rağmen mutasyonların zararlı etkileri bazen bakteride başka yollar ile karşılanabilmektedir. Eğer mutasyon ile gelişen direnç bakteriye zarar vermeden yüksek sıklıkta ortaya çıkıyorsa, o antibiyotik kullanıldığında kısa bir süre içinde direnç gözlenecektir (6).

2-) Direnç genlerinin dışarıdan alınması: Direnç genlerinin duyarlı bakterilere iletiminde en sık gözlenen mekanizma konjugatif plazmidlerin geçiştir. Bazı plazmidler konak açısından çok özgül olmasına karşın bazıları çok sayıda farklı tür bakteriye girip replike olabilmektedir. Transpozonlar tarafından direnç genleri, plazmidten plazmide veya kromozoma ya da kromozomdan plazmide iletilebilmektedir. İntegronlar direnç determinantlarının alınmasını ve ifadesini kolaylaştıran doğal rekombinasyon sistemleridir. Çeşitli β -laktamazlar ve aminoglikozid değiştirici enzimlere ait genler integronlarda bulunmaktadır. İntegronların direnç genlerinin yayılımı ve ifadesi için önemli bir kapasiteleri olmasına karşın gram negatiflerde daha yaygın olarak genlerin integronlardan çok transpozonlarda taşındığı gözlenmektedir (6).

3-) Dışarıdan alınan genlerde mutasyon oluşması: Bu mekanizmaya en iyi örnek GSBL enzimleridir. Bu enzimlerin plazmid kontrolünde sentezlenen TEM-1 β -laktamazından 1-2 nokta mutasyonu sonucu oluştuğu tespit edilmiştir (6).

4-) İlacın hedef bölgesinde gelişen değişiklikler: PBP deki değişiklikler kromozomal mutasyonlar sonucunda oluşur. PBP in sayısında azalma ve/veya β -laktam antibiyotiklere karşı afinitelerinde azalma meydana getirebilmektedir. Buna bağlı direnç *Neisseria meningitidis*, *H. influenzae* ve *Pseudomonas spp.*'de gözlenmiştir (31).

5-) Dış membran geçirgenliğinin bozulması: β -laktamlar dış membrandaki OMP ile porin F ve porin C vasıtasıyla hücreye girmektedir. İmipenem ayrıca D2 proteini denilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla porin F ve C proteinlerinde mutasyon olursa tüm β -laktamlara direnç gelişebilirken, imipeneme direnç gelişmez. Diğer yandan *Enterobacter* ve özellikle *P. aeruginosa* suşlarında D2 protein kaybı bakteriyel izolatin imipeneme dirençli duruma gelmesine neden olabilir. Ancak bu tipte direnç geliştiren bakteri, diğer β -laktamlara karşı

çapraz direnç oluşturmaz (32). Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiklerin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir (33). İmipenem, diğer β -laktamlara kıyasla daha düşük moleküler ağırlıkta olduğundan porinlerden daha hızlı bir geçiş göstermektedir (34). Geçirgenliğin azalmasına bağlı olan direnç özellikle enzimatik direnç ile birlikte ise yüksek düzeyde direnç yol açmaktadır. Bu direnç *P. aeruginosa* ve diğer gram negatif basillerde daha fazla klinik probleme yol açar (35).

7-) β -laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi: β -laktamlara karşı en sık saptanan direnç β -laktamazlar ile olmaktadır. Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinde β -laktam direncindeki en önemli mekanizma β -laktamaz üretimidir. β -laktamaz genleri bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilir. β -laktamazlar, β -laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak β -laktamların etkinliğini ortadan kaldırırlar. β -laktamazlar yapısal olarak PBP'e benzerler (36).

2.3.2 *Enterobacteriaceae*da Karbapenemlere Direnç ve Mekanizmaları

Karbapenemler; geniş spektrumlarıyla, bakteriyel zarlardan hızlı geçebilmeleriyle, AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olma gibi özellikleriyle çoklu dirençli gram negatif infeksiyonlarında ilk tercih edilen β -laktam antibiyotiktirler. Fakat bu antibakteriyel grubun özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, karbapenemlere karşı artan direnç oranlarına neden olmuştur (30).

Enterobacteriaceae ailesinde gözlenen karbapenem direnci toplum sağlığı açısından önemli bir sorun teşkil etmektedir. Karbapenemlere karşı gelişen direnç mekanizmaları; β -laktamazların üretimi, atım (efluks) pompaları, porin kaybı ve penisilin bağlayıcı proteinlerin fonksiyonlarını ve sayılarını değiştiren mutasyonlar olarak özetlenebilir. Bakterilerde bu mekanizmaların birkaçının birlikte görülmeleri yüksek düzey karbapenem direncine yol açabilmektedir (25).

1-) Porin değişimleri: Porin kaybı ve kromozomal AmpC β -laktamazlarının aşırı üretimi ile oluşan imipenem direnci *Enterobacter spp.*'de tanımlanmıştır (37). Özellikle CTX-M tipi GSBL'lerin enterik bakterilerde yayılması karbapenem

direnci gelişmesini kolaylaştırdığı bildirilmektedir (38). *K. pneumoniae*'da da yine porin kaybı ve plazmid aracılıklı AmpC β -laktamazın (ACT-1) varlığıyla direnç gelişir. *Klebsiella spp.*'de porin kaybıyla birlikte SHV tipi GSBL ile ilişkili karbapenem direnci de bildirilmiştir (39).

2-) Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi: Yeni çalışmalar aktif pompalama sistemlerinin *E. coli* ve *K. pneumoniae* da bakterinin çoklu ilaç direncinde belirgin rol oynadığını göstermektedir. *E. coli*'de AcrA-AcrB-TolC, *K. pneumoniae*'da Ram A örnek olarak verilebilir (35).

3-) Hedef PBP değişimleri: PBP proteinlerindeki mutasyonlar ve/veya PBP transkripsiyonundaki azalmalar da karbapenem dirençli fenotiplerin ortaya çıkması ile sonuçlanmaktadır. Genellikle diğer mekanizmalar ile birlikte dirler (25).

4-) Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı: Karbapenemazlar 1990 öncesinde tanımlanan, karbapenem direnci ile sonuçlanan karbapenem hidroliz eden β -laktamazlardır. Kromozomal veya plazmid kaynaklıdır (40).

2.3.3 β –Laktamazlar

İlk olarak 1940 da *E. coli* tarafından üretilen bir enzimin, penisilinin bakteriyel hücreleri öldürme özelliğini ortadan kaldırdığı gösterilmiştir (41). Bu enzimler, β -laktamların diğer antimikrobiyallerden ayırıcı özelliği olan β -laktam halkasını hidrolize ederek bakterileri öldürme etkisini ortadan kaldırmaktadır (42).

S.typhimurium'da 1965 de Anderson ve Datta tarafından ampisilin direnci bildirmişlerdir (43). Bu direnç hızlı bir şekilde *E. coli* suşlarına yayılmış ve Yunanistan'da bir hastanın kan kültüründen üreyen *E. coli* de tanımlanan enzime izole edildiği hastanın ismine (Temoniera) ithafen TEM-1 ismi verilmiştir. 1978'den sonra pek çok yeni β -laktam antibiyotiğin (sefamisinler, karbapenemler ve monobaktamlar) kullanıma girmesi ve tanımlama yöntemlerindeki gelişme ile birlikte gram negatiflerde β -laktamazların sayı ve çeşidinde hızlı bir artış saptanmıştır (44). 1980'lerin başında *Klebsiella* suşlarında bir β -laktamaz tanımlanmış ve SHV-1 (sülfidril hiper variabl) ismi verilmiştir. 1983 te Almanya'da *K. pneumoniae* ve *Enterobacter* izolatlarında üçüncü kuşak

sefalosporinleri de hidrolize eden plazmid kaynaklı yeni bir β -laktamaz bulunmuş ve SHV-1 den mutasyonla oluştuğundan enzime SHV-2 ismi verilmiştir. Günümüzde 1000'in üzerinde farklı β -laktamaz enzimi tanımlanmıştır (45). β -laktamazlar çeşitli şekillerde isimlendirilmişlerdir:

- Etkiledikleri substratlara göre: CARB (karbenisilin), IMP (imipenem), OXA (oksasilin),
- Biyokimyasal özelliklerine göre: SHV (aktif bölgede serin vardır),
- İlk izole edildikleri bakterilere göre: AER (*Aeromonas*), PSE (*Pseudomonas*),
- İlk izole edildikleri suşlara göre: P99,
- İlk izole edildikleri hasta isimlerine göre: TEM (Temoniera), BIL (Bilal),
- İlk izole edildikleri eyaletlere göre: OHIO,
- İlk izole edildikleri hastaneye göre: MIR (Miriau Hospital), DHA (Dhahran Hospital),

β -laktamazlar, hidrolitik etki spektrumlarına, inhibitörlere karşı duyarlılıklarına, aminoasit ve nükleotid dizilimine, kromozom veya plazmid aracılı olarak kodlanmalarına, biyokimyasal özelliklerine, izoelektrik noktalarına göre sınıflandırılmışlardır (36). Bu sınıflandırmalardan birincisi, 1980'de Ambler tarafından moleküler yapılarına, enzimleri kodlayan aminoasit ve nükleotid dizilerine dayanan sınıflandırmadır (46). Buna göre β -laktamazlar dört sınıfa (A, B, C ve D) ayrılmışlardır. Sınıf A, C ve D aktif bölgelerinde serin, Sınıf B ise çinko taşırlar. Sınıf A, B ve D daha çok plazmid, sınıf C ise çoğunlukla kromozom kontrolündedirler (2). Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından 1995 te geliştirilmiş olan ikinci sınıflandırma ise substrat profilleri ve β -laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikleri esas alınarak yapılan sınıflandırmadır. Sınıflandırma dört grupta yapılmış, 2009 da güncellenmiştir (4). Tablo 2.6 da gösterilmiştir.

Grup 1: Moleküler sınıflamada sınıf C'de yer alan, birçoğu kromozomal olarak kodlanan sefalosporinazlardır. Kromozomal AmpC enzimleri yanında plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 gibi β -laktamazlar da bu

grupta yer almaktadır (33). β -laktamaz antibiyotikler ile karşılaştıklarında bu grup enzimleri çok arttığından dolayı 'indüklenebilir β -laktamazlar' olarak da isimlendirilirler. *Salmonella* dışındaki diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunurlar (36).

Grup 2: Bu serin β -laktamazlar en geniş kategoriye oluşturmaktadır. Moleküler sınıflandırmaya göre sınıf A ve D'de yer almaktadırlar. Bu β -laktamazlar penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etmelerine göre alt gruplara ayrılır. Bunların en büyük grubu GSBL dır (47).

Grup 3: MBL, Moleküler sınıflandırmada sınıf B'de yer alan bu enzimler, penisilinler, sefalosporinler ve karbapenemleri hidrolize ederler. Bu grup enzimler β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez iken EDTA ile inaktive olurlar (48).

Grup 4: Bu grup klavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazları içerir. Yapıları tam olarak saptanamamış olan bu enzimler henüz moleküler olarak sınıflandırılmamışlardır (49).

Çok sayıda farklı enzimleri sınıflandırırken proteinlerin yapısını esas alarak yapılan bir sınıflandırma daha kolay olsa da fonksiyonel sınıflandırmanın önemli başka avantajları vardır. Fonksiyonel sınıflandırma ile enzimlerin klinik rolü hakkında ilişki kurma fırsatı sağlamaktadır. Örneğin farklı sınıf β -laktamlardan hangisine seçici direnç olduğunu bilmeye olanak tanımaktadır. Hiç kuşkusuz fonksiyonel gruplamalar, yapısal sınıflara göre bir klinik izolatta gözlenen direnç profili ile özgül 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 gözünmektedir. Bugün için en geçerli sınıflandırma olarak kabul edilmektedir (50).

Tablo 2.6. Güncellenmiş β -laktamaz grupları ve genel özellikleri

BJG (2009)	BJMG (1995)	Moleküler sınıf (alt sınıf)	Ayrııcı substratlar	İnhibe edenler		Tanımlayıcı Özellikler	Tipik Enzimler
				KA/TZB	EDTA		
1	1	C	Sefalosporinler	H	H	Genelde kromozomal enzimlerdir. Sefalosporinleri, benzilpenisilinlerden daha fazla hidrolize ederler.	AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	DE	C	Sefalosporinler	H	H	Oksimino β -laktamları (sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefepim, aztreonam) daha fazla hidroliz ederler.	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penisilinler	E	H	Benzilpenisilinleri, sefalosporinlerden daha fazla hidrolize ederler.	PC1
2b	2b	A	Penisilin, sefalosporinler	E	H	Benzilpenisiller ve sefalosporinleri benzer hidroliz ederler.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Sefalosporinler aztreonam	E	H	Oksimino β -laktamları daha fazla hidroliz ederler.	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penisilinler	H	H	β -laktamaz inhibitörlerine dirençlidir.	TEM-30, SHV-10
2ber	DE	A	Sefalosporinler aztreonam	H	H	Oksimino β -laktamları daha fazla hidroliz ederler.	TEM-50
2c	2c	A	Karbenisilin	E	H	Karbenisilini daha fazla hidroliz ederler.	PSE-1, CARB-3
2ce	DE	A	Karbenisilin, sefepim	E	H	Karbenisilin, sefepim ve sefpiromun daha fazla hidroliz ederler.	RTG-4 CARB-10
2d	2d	D	Kloksasilin	De	H	Kloksasilini ve oksasilinin daha fazla hidroliz ederler.	OXA-1, OXA-10
2de	DE	D	Sefalosporin	V	H	Kloksasilin, oksasilin ve oksimino β -laktamları daha fazla hidrolize ederler.	OXA-11, OXA-15
2df	DE	D	Karbapenemler	V	H	Kloksasilin ve karbapenemleri daha fazla hidrolize eder	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Sefalosporinler	E	H	Sefalosporinleri hidrolize ederler. Aztreonam ile inhibe olmazlar.	CepA
2f	2f	A	Karbapenemler	De	H	Karbapenemler, oksimino β -laktamlar ve sefamisinlerin daha fazla hidroliz ederler.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1) B(B3)	Karbapenemler	H	E	Çinko bağımlıdır. Karbapenemleri daha fazla hidrolize ederler. Monobaktamları zayıf hidroliz ederler. Metal şelatörleri ile inhibe olurlar.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B2	Karbapenemler	H	E	Karbapenem hidrolizine yatkınlık	CphA, Sfh-1
DE	4	Sınıflanmamış				Dizileri bilinmeyen enzimler	

KA: Klavulanik Asit, TZB: Tazobaktam, DE: Dahil Edilmemiştir, H: Hayır, E: Evet, De: Değişken, BJG: Bush- Jacoby grubu, BJMG: Bush- Jacoby- Medeiros grubu

2.3.4 Karbapenemazlar

Karbapenemazlar intrinsik (kromozomal) veya ekstrinsik (kazanılmış) olabilirler (40).

1-) İntrinsik karbapenemazlar: *Basillus cereus* II, *Bacteroides fragilis*'in CcrA, *B. cepacia* 'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *Chryseobacterium indologenes* 'in IND-1-4, *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*'un blaB enzimleri örnek verilebilir. Tüm bu enzimler fonksiyonel sınıflanmada grup 3'te olan MBL'lardır (4).

Moleküler sınıflamaya göre sınıf B de olan β -laktamazlar: *S. maltophilia*, *Flavobacterium odoratum*, *C. meningosepticum*, *C. indologenes*, *Aeromonas hydrophilia*, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas salmonicida*, *Legionella gormanii* ve *B. cereus*'da yaygın olarak bulunurlar (4).

Kromozomal olarak kodlandıklarından dolayı enzimleri yavaş yayılır dolayısıyla direncin artması yavaş olmaktadır. Yine de direnç paternleri değişebilir. Düşük düzey direncin ne kadarı β -laktamaz aracılığıyla olduğu bilinmemektedir. Fakat yüksek düzey direnç β -laktamaz ile ilgilidir (4).

2-) Ekstrinsik karbapenemazlar: Sınıf A da *Enterobacteriaceae spp*'de, sınıf B de *Acinetobacter spp*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae spp*'de, sınıf D de ise *Acinetobacter spp* saptanmıştır (51). Fonksiyonel sınıflamada karbapenemazlar grup 2d, 2f ve 3 içerisinde yer alırlar.

Enterobacteriaceae ailesinin bazı üyelerinde kromozomal, bazılarında plazmid aracılı kazanılmış β -laktamazlar gözlenmektedir. Karbapenemaz aktivitesine sahip olup *Enterobacteriaceae* ailesinde sık görülen β -laktamaz enzimler Tablo 2.7 de sunulmuştur.

Tablo 2.7. *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip β -laktamaz enzimler

Moleküler sınıf (fonksiyonel grup)	Gen bölgesi	Enzimler	KA	EDTA	ATM	Organizmalar
A (2f)	Kromozomal	Sme-I, Sme-3, IMI-I, IMI-3, NmcA, SFC-I,	$\pm$	-	R	<i>S.marcescens</i> ve <i>E.cloacae</i>
	Plazmid	KPC-2, KPC-13,	$\pm$	-	R	<i>Enterobacteriaceae</i>
		GES-I, GES-20	+	-	S/R	<i>Enterobacteriaceae</i>
B (3)	Kromozomal / Plazmid	IMP-1, IMP-33, VIM-1, VIM-33, NDM-1, NDM-6, SPM-1, SIM, GIM, IND-1, IND-7, AIM, DIM, KHM	-	+	S	<i>Enterobacteriaceae</i>
D (2df)	Kromozomal / Plazmid	OXA-23 grup (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24grup (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 grup (OXA-40, OXA-143, OXA-58) OXA-48 grup (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	$\pm$	-	S	<i>Enterobacteriaceae</i>

KA: Klavunat, EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit, ATM: Aztreonam

Sınıf A karbapenemazlar

Fonksiyonel sınıflandırmada grup 2f de yer alırlar. Aktif bölgelerinin 70 pozisyonunda serine ihtiyaç göstermeleri ile karakterize, öncelikle penisilinleri hidroliz eden β -laktamazlardır (48). Karbapenemleri, penisilinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri (GSS) ve aztreonama (ATM) direnç gelişmesine neden olan ve tazobaktam başta olmak üzere β -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar (1). Bu direnci taşıyan izolatlarda karbapenemazlara ilave olarak AmpC ve TEM-1 tipi β -laktamazları da birlikte sentezleyebilmelerinden ötürü oldukça geniş spektrumlu β -laktam direncine neden olabilirler (51).

Seftazidim ve sefoksitin için zayıf bir hidroliz söz konusudur. Bu durumda GSBL ile karıştırılabilirler ancak A sınıfı karbapenemazlarda karbapenem hidroliz aktivitesi mevcuttur. Ayrıca bu aktivite klavulanat ve tazobaktam ile zayıf inhibisyon gösterir (2).

E. cloacae'nin IMI-1 (imipenem-hydrolyzing), ve NMC-A (not metalloenzyme carbapenemase) ile *S. marcescens*'in SME-1 ve 2 kromozomal, *K. pneumoniae*'nin KPC-1 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ile *P. aeruginosa*'daki GES-2 (Guiana extended spectrum) plazmidik olup bu grubun enzimleridir. IMI-1 ve SME-1 üretenler bakteriler imipenemin kullanıma girmesinden önce bulunmuşlardır. Bu gruptaki enzimler imipeneme nispeten diğer karbapenemlere göre etkinliği daha fazla olan penisilinazlardır. Oksiminosefalosporinler, sınıf A enzimleri için zayıf substratlar olup ve dirence neden olmaz (40). Üçüncü kuşak sefalosporinlere hassas ancak imipenem dirençli izolatların elde edilmesi altta yatan SME, NMC veya IMI β -laktamaz üretimi olasılığını akla getirmelidir (52).

2010 yılından önce önerilmiş olan duyarlılık sınırları kullanıldığında, KPC üreten birçok *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşu duyarlılık aralığında imipenem ve meropenem MİK'e sahipti. Bu durum otomatize sistemler açısından problem oluşturuyordu (53). Bir raporda, KPC üreten *K. pneumoniae*'ların % 87'si karbapeneme duyarlı olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak, karbapenemaz varlığından şüphe edilmemiştir (54).

Sınıf B metalloenzimler

Aktiviteleri için çinkoya ihtiyaç duymaları sebebiyle metallo β -laktamaz olarak da isimlendirilirler. β -laktamaz inhibitörleriyle inhibe edilemezken, EDTA ile inhibe olur (4). Hidrolitik aktiviteleri diğer sınıf karbapenemazlara oranla daha fazla olup, karbapenem MİK değerleri daha yüksektir (2).

Rasmussen ve Bush, grup 3 MBL ları 3 alt grupta sınıflamıştır: 3a, 3b, 3c. 3a'da imipenem ve penisilinleri diğer β -laktamlara nispeten daha hızlı ve yüksek oranda hidrolizleyen enzimler bulunur. 3b de özgül olarak karbapenemleri hidrolizleyen "gerçek karbapenemazlar" bulunur. 3c de ise sadece *L. gormanii*'nin MBL'ı bulunur (39).

Doğal olan MBL lar kromozomaldır ve *A. hydrophilia*, *Chryseobacterium* spp ve *S. maltophilia* türlerinde tespit edilmiştir. Edinilmiş MBL lar plazmidlerin integronlarında kodlanmış genlerden oluşmaktadır. ATM hariç tüm β -laktamları hidrolize eden IMP ve VIM en sık görülenleridir (55).

K. pneumoniae, serin β -laktamazların genelde orijinal konağı olmasına rağmen, MBL ların enterik bakteriler arasında yayılımına katkısı olduğu görülmektedir (56).

MBL üreten bakteriler genelde diğer grup β -laktamazları da üretirler. Grup 1 β -laktamaz üreten bakterilerde olduğu gibi burada da total fenotip olarak hem geniş hem de etkili bir direnç profili ortaya çıkar (57). Gram negatiflerde kombine direnç mekanizmaları ve çok sayıda β -laktamaz varlığı nedeniyle karbapenem direnç düzeylerinin klinik olarak önemli düzeylere çıkabileceği ve karbapenem kullanımının MBL üretimini doğrudan etkilediği gerçeği dikkate alınmalıdır (58).

IMP (imipenemase) tipi β -laktamazlar: İlk 1988 de Japonya’da bir *P. aeruginosa* izolatında MBL enzimi tespit edilmiş ve direnç genini plazmid de taşındığı saptanmıştır (59). Bu saptamadan üç yıl sonra 1991’de yine Japonya’da bir *S. marcescens* izolatından aynı MBL geni izole edilmiştir (60). Sonraki yıllarda Japonya’ nın farklı bölgelerinden saptanan MBL ile ilgili yapılan çalışmalarda saptanan tüm enzimlerin aynı aminoasit dizisine sahip olduğu belirlenmiş ve diğer β -laktam ajanlar yanında özellikle imipenemi hidrolize edebilme yeteneğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir (39). Zaman içerisinde farklı coğrafik bölgelerden çok sayıda yeni varyantları tanımlanmıştır (61).

NDM (New Delhi metallo β -lactamase) tipi β -laktamazlar: Diğer kazanılmış β -laktamazlar gibi ATM hariç diğer tüm β -laktamları parçalar, bunu da genelde GSBL veya AmpC β -laktamaz ortak üretimi ile yapar (62).

VIM (Verona integron-encoded metallo β -lactamase): İlk 1997 de İtalya’da bir *P. aeruginosa* suşunda Verona integronunda kodlanmış olarak VIM-1 tanımlanmış, genlerinin de kromozomal yerleşimli olduğu saptanmıştır (63). BlaIMP genleri gibi blaVIM genlerinin de integronlar içinde gen kasetlerinde bulunduğu tespit edilse de VIM-1, IMP benzeri enzimlerden oldukça farklıdır (64).

Sınıf C ile karbapenem direnci:

Aktiviteleri için serin aminoasiti bulunduran, çoğunlukla sefalosporinazları içeren, kromozomal blaAmpC ile kodlanmasından dolayı AmpC enzimleri olarak da isimlendirilen β -laktamazlardır. Kromozomal AmpC enzimlerinin aşırı üretimi ile dış membran porin değişimlerinin kombinasyonları karbapenem direncine sebep olan yüksek ihtimalle en genel direnç mekanizmasıdır. Bu durum *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumonia*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, *E. coli*, *P. aeruginosa* gibi izolatlarda bildirilmiştir (4).

AmpC β -laktamaz yapımı antibiyotikle karşılaşma bittikten sonra düşük düzeylere iner. Ancak genin Amp D lokusunda bir spontan mutasyon gelişir ise bu bakteride aşırı üretim (derepresyon) söz konusu olur. GSS in tedavisi sırasında stabil mutantların seçiminden sonra görülebilen bu durum sefepim için geçerli değildir (65).

Sınıf D karbapenemazlar

Oksasilini klasik penisilinlerden daha hızla hidrolize uğratmalarından dolayı oksasilinazlar olarak adlandırılmıştır. Klavulanat ve EDTA ile zayıf inhibisyon gösterirler. Genelde seftazidim, sefotaksim ve ATM'ı hiç hidrolize etmez ya da zayıf şekilde hidrolize ederler. OXA 23-27-49 (grup 1), OXA 24-25-26-40-72 (grup 2), OXA-51 (grup 3), OXA-58 (grup 4) *Acinetobacter* spp. de, OXA-48 (grup 5) ise *E. coli*, *Klebsiella* ve *Citrobacter* spp. de dirence sebep olmaktadır. Çoğu OXA imipenem ve özellikle meropeneme zayıf hidrolitik aktivite gösterir (2).

2.3.5 Karbapenemaz Aktivitesinin Saptanması

Enterobacteriaceae'da CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) ve ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) e göre duyarlı aralıklarda düşük karbapenem MİK'leri ile karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* tanımlandığından beri karbapenemaz tespiti ilgi çekmektedir (66). Antibiyotik tedavisinde doğru tercihleri yapabilmek ve hastanede oluşabilecek bir salgın

durumundan kaçınabilmek için karbapenamaz üreten bakteriler hızlı ve doğru şekilde tespit edilmelidir (67). Karbapenamaz üreten bakterileri saptama stratejisinde; karbapenem MİK değerlerinde artış ya da inhibisyon zon çaplarında bir azalma olan klinik bir izolatta karbapenamaz üretiminden şüphelenilmeli, sonra karbapenamaz tarama basamağı ardından fenotipik ve genotipik doğrulama basamaklarını içermelidir (68).

Tablo 2.8. EUCAST göre *Enterobacteriaceae* için karbapenem duyarlılık sınır ve tarama eşik değerleri (69)

<i>Enterobacteriaceae</i>		Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değeri (mg/L)			Zon çapı sınır değeri (mm) 10 µg disk ile		
		Tarama eşik değeri	Duyarlı ≤	Dirençli >	Tarama eşik değeri	Duyarlı ≥	Dirençli <
	Meropenem ¹	> 0.12	2	8	<25 ²	22	16
	İmipenem ³	>1	2	8	<23	22	16
	Ertapenem ⁴	> 0.12	0,5	1	<25	25	22
	Doripenem	-	1	2	-	24	21

¹Duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan

²Bazı durumlarda OXA-48 üreten izolatlar için zon çapı 26 mm'ye kadar ulaşabilmektedir. Dolayısıyla ülkemiz gibi OXA-48 üreticilerinin endemik olduğu yerlerde meropenem tarama sınır değerinin <27 mm olarak kullanımı önerilmektedir.

³İmipenem ile sokak tipi (Wild type) ve karbapenamaz üreticileri arasındaki ayırım göreceli olarak zayıftır. Bu nedenle imipenemin tek tarama bileşiği olarak kullanılması önerilmemektedir.

⁴Yüksek duyarlılık ancak düşük özgüllük, bu nedenle rutin tanımlama için önerilmemektedir.

Tablo 2.9. CLSI göre *Enterobacteriaceae* için karbapenem duyarlılık sınır ve tarama eşik değerleri (2)

<i>Enterobacteriaceae</i>		Minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) sınır değeri (µg/mL)			Zon çapı sınır değeri (mm) 10 µg disk ile		
		Tarama eşik değeri	Duyarlı ≤	Dirençli ≥	Tarama eşik değeri	Duyarlı ≥	Dirençli ≤
	Ertapenem ¹	0,5	0,5	2	≤23	22	18
	Meropenem	1	1	4	≤23	23	19
	İmipenem	1	1	4	≤22	23	19
	Doripenem	1	1	4	≤23	23	19

¹CLSI göre orta duyarlı ya da dirençli bulunması, karbapenamaz üreten bakterilerin tespit edilmesinde en duyarlı belirteç olarak önerilmektedir.

İki kılavuz arasındaki farklılıklar sınır değer belirlemede kullanılan farmakokinetik/farmakodinamik yaklaşımlardan doğmaktadır. Her iki kılavuzda da 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, CLSI da ise % 90 olarak kullanılmıştır. Ek olarak CLSI, yükselmiş varyans 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 (70). Fakat her iki kılavuzun belirlediği klinik sınır değerlerin altında MİK değerlerine sahip karbapenemaz üreticileri sıklıkla izole edilmektedir. Özellikle OXA-48 üreten bakterilerin karbapenemler için düşük MİK değerlerine sahip suşların varlığı dikkati çekmektedir (71). Kılavuzlardaki karbapenem sınır değerlerinin altında MİK değerlerine sahip fakat karbapenemaz üretmekte olan suşları yakalayabilmek için EUCAST tarafından belirlenen epidemiyolojik sınır değerler kullanılabilir (69). EUCAST, karbapenemaz taramasında ertapenemi, azalmış permeabilite ve β -laktamazlar (GSBL veya AmpC gibi) varlığında düşük stabilitesi ve özgülüğünden dolayı önermemektedir (71).

Tablo 2.10. Karbapenemaz veya GSBL direnç mekanizması saptanmasının önemi(69)

Antimikrobiyal duyarlılık saptanması için gereklidir	Hayır
Enfeksiyon kontrolü	Evet
Halk sağlığı	Evet

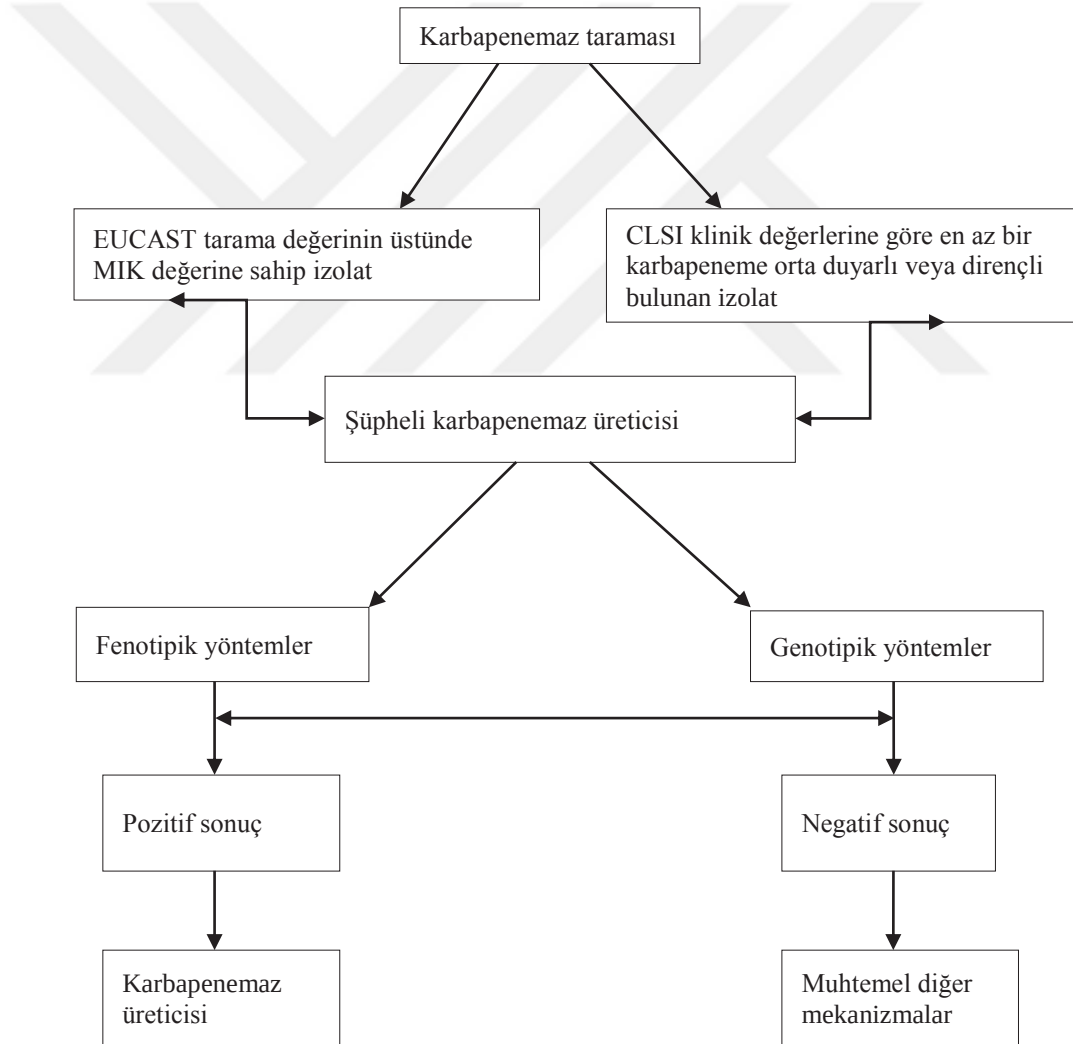
Tablo 2.11. *Enterobacteriaceae* da karbapenemler için MİK değerlerinin dağılımı (71)

<i>Enterobacteriaceae</i>	Minimal İnhibitör Konsantrasyon (mg/L)		
	Ertapenem	Meropenem	İmipenem
KPC	0,5 ile >32	0,5 ile >32	0,5 ile >32
IMP/VIM/NDM	0,38 ile >32	0,5 ile >64	0,5 ile >32
OXA-48/OXA-181	0,38 ile >32	0,5 ile >64	0,25 ile >64

Tablo 2.12. GSBL pozitif veya negatif *Enterobacteriaceae* da direnç profilleri (71)

	KPC	KPC + GSBL	IMP/VIM/NDM	IMP/VIM/NDM + GSBL	OXA-48/ OXA-181	OXA-48/ OXA-181 + GSBL
AMC	S/I	I/R	R	R	R	R
TZB	R	R	I/R	I/R	S/I/R	I/R
CTX	R	R	R	R	S/I	R
CAZ	R	R	I/R	R	S	R
IMP	S/I/R	I/R	S/I/R	I/R	S/I	I/R
ETP	I/R	I/R	I/R	R	S/I	I/R
MER	S/I/R	I/R	S/I/R	S/I/R	S/I	I/R
AZT	R	R	S	R	S	R

AMX, amoksisilin; AMC, amoksisilin-klavulanik asit; TZB, piperasilin-tazobaktam; CTX, sefotaksim; CAZ, seftazidim; IMP, imipenem; ETP, ertapenem; MER, meropenem; ATM, aztreonam; S, duyarlı; I, orta duyarlı; R, dirençli



Şekil 2.4. Karbapenemaz üreticilerinin saptanmasına yönelik algoritma

Karbapenemazların fenotipik olarak saptanması

Karbapenemaz üreten bakterilere yönelik tarama sonrasında şüpheli bulunan bir suş uygun fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak doğrulanması gerekmektedir. Çünkü bakteride karbapenem direncine yol açabilecek karbapenemaz dışında başka mekanizmalar olabilir (2). Karbapenemaz aktivitesini tespit etmek için önerilen moleküler olmayan testler iyi özgüllük ve duyarlılıklara sahip olmalarına rağmen hiçbiri % 100 değildir (67). Karbapenem dirençli izolatların saptamasında broth mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon, E-test ve otomatize yöntemlerden çok daha yüksek duyarlılık sahibidir (2).

1. Modifiye Hodge Testi (MHT)

Uygulanması kolay fenotipik yöntemlerden biridir. Bu test imipeneme duyarlı *E.coli* suşunun karbapenemaz üreten bir bakteriyle birlikte bulunduğu inhibisyon zonunun daralmasıyla karakterizedir (73).

Test için 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Mueller Hinton buyyonda seyreltildikten sonra Mueller Hinton Agar (MHA) plağına ekilir. Karbapenem disklerinden biri plak merkezine yerleştirilir. Bir öze veya eküvyon ile 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterisi alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20-25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilir ve plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilir. Bu plakta, test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışına bakılır. Üremede artış varlığı karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilir (2).

2. İnhibitör tabanlı testler

EUCAST MHT'inde elde edilen sonuçları değerlendirmedeki güçlükler, özgüllüğündeki düşüklük ve bazı durumlarda duyarlılığının da optimalin altında olması gibi sebeplerden dolayı önermemekte, bunun yerine karbapenemazlara özgün inhibitörlerin ilavesiyle karbapenemaz aktivitesinin in vitro olarak belirleyen inhibitör tabanlı testlere yer vermektedir. Kılavuzda sinerji varlığını ticari kitlerin önerileri doğrultusunda tespit edilmesini, fenotipik testin yorumlanmasına yönelik öneriler bulunmaktadır (72).

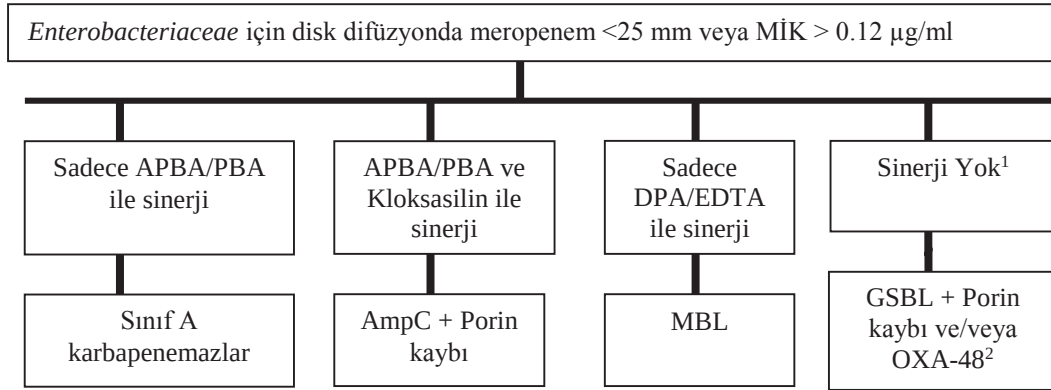
Bu inhibitörlerle yapılan fenotipik testlerde, tek başına karbapenem ile karbapenem-karbapenemaz inhibitör kombinasyonları karşılaştırılmakta ve inhibisyon zon çapında artış ya da MİK değerlerinde düşme olup olmaması in vitro olarak araştırılmaktadır (74). Karbapenem ile inhibitör arasındaki sinerji pratikte değişik tekniklerle doğrulanabilir:

- Kombine disk testlerinde; Test edilecek izolat MHA ekildikten sonra karbapenem diski ile inhibitör emdirilmiş karbapenem diski yerleştirilir. İnkübasyonu takiben zon çapları ölçülerek aralarında fark oluşup oluşmadığı incelenir (75).
- Çift disk sinerji testlerinde; steril disklere inhibitör emdirilir ve karbapenem diskiyle aralarında belli mesafe olacak şekilde yerleştirilir. Karbapenem diski ile inhibitör arasında bir sinerji olması pozitif sonuç olarak değerlendirilir (76).
- Metallo β -laktamaz aktivitesini saptamak amacıyla hazırlanan imipenem ve imipenem/EDTA kombinasyonlarını içeren gradiyent difüzyon testi şeritleri kullanılabilir (71).

Sınıf A karbapenemaz inhibitörleri: Boronik asit kullanılmaktadır. İnhibisyon mekanizması bilinmemektedir (68). Ticari olması ve neticesi için bir güne daha gerek olması sebebiyle rutin olarak tercih edilmemektedir (77).

Sınıf B karbapenemaz inhibitörleri: MBL aktiviteleri için divalan katyonlara, metal kofaktörler olarak ihtiyaç duymakta, dolayısıyla aktif bölgelerinden bu katyon ve kofaktörlerin uzaklaştırılması sonucu da aktiviteleri etkilenmektedir (73). EDTA, 2-merkaptopropionik asit veya DPA ile karbapenem ve/veya oksid amino sefalosporin arasındaki sinerjiye dayanmaktadır (68).

Sınıf D karbapenemaz inhibitörleri: Rutin laboratuvarında kullanılan bir inhibitörü bulunmamaktadır (68).



APBA=Aminofenil boronik asit, PBA= fenil boronik asit, DPA= Dipikolinik asit, EDTA, etilen diamin tetraasetik asit, MBL= Metallo beta laktamaz

¹KPC ve MBL birlikteliği de sinerji görülmemesine neden olur. Normal olarak bu izolatların karbapenemlere yüksek düzeyde dirençlidir. En kolay moleküler yöntemlerle saptanırlar.

² Yüksek düzey temosilin direnci (MİK > 32 mg/L veya temosilin diski (30µg) ile ≤10 mm zon OXA-48 için fenotipik belirleyicidir.

Şekil 2.5. EUCAST'e göre inhibitör testlerinin yorumlanması ile ilgili akış şeması (69)

3. Enzim ekstraksiyonu uygulaması

İzolattan sonikasyon yöntemiyle elde edilen enzim karbapenem diski üzerine eklenerek kombine diskler oluşturulur. 0.5McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları hazırlanan MHA plağı üzerine kombine karbapenem diski ile kombine olmayan karbapenem diski yerleştirilir. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra enzim içeren diskin inhibisyon zon çapında içermeyen diskin inhibisyon zon çapına göre 2 mm ve daha fazla azalma olması karbapenemaz üretimi açısından anlamlı kabul edilir (77).

4. UV Spektrofotometre

18 saatlik kültür, protein ekstraksiyon aşaması ve UV spektrofotometre kullanılarak imipenem hidrolizinin ölçülmesi basamaklarından oluşur. % 100 duyarlılığa ve % 98.5 özgüllüğe sahiptir (78).

5. Selektif besiyerleri

Karbapenemaz üreten organizmalardan çok karbapenem dirençli bakteriler için farklı selektif besiyerleri vardır (67). Karbapenem dirençli bakteriler ile kolonize hastaların doğru bir şekilde tespit edilmesine dayanmaktadır (79).

CHROMagar, KPC besiyeri olup yalnızca karbapenemlere yüksek düzey direnç gösteren bakterileri tespit eder. Bu nedenle temel dezavantajı duyarlılığının düşük olmasıdır (79). CRE besiyeri de KPC, MBL ve OXA-48 üreten bakterilerin tespit eder. Supercarba besiyeri ise kloksasin, çinko ve ertapenem içermektedir (67). Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'nin fenotipik olarak tespit edilmesinde son gelişmelerden Carpa NP ile karbapenem hidrolizi sonucu oluşan pH değişimi, indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı solüsyonunun rengi kırmızıdan sarıya dönmesi ile pozitif sonuç olarak değerlendirilir(80). Bu test, KPC, NDM, VIM, IMP,SPM ve SME'nin *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında tanımlanmasında >% 90 duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir. Testin duyarlılık ve özgüllüğü diğer karbapenemazların üretimini saptamada değişkenlik göstermektedir. Örneğin OXA-48 karbapenemazını saptamada duyarlılığı düşüktür (<%11). (CLSI M100 S25).

Karbapenemazların moleküler yöntemlerle saptanması

Karbapenem direncinden şüphe edildiğinde çeşitli fenotipik yöntemler önerilmekte, ancak direncinin karbapenemaz aktivitesi vasıtasıyla meydana gelip gelmediği her zaman belirlenememektedir. Aynı anda gerçekleşen diğer direnç mekanizmalarıyla da karbapenem MİK değerleri yükselebildiğinden sadece fenotipik yöntemlerle karbapenemaz aktivitesi saptamaya çalışıldığında yalancı pozitif sonuçlar ile karşılaşılabilir (2). Genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir. Karbapenemazların tespit ve birbirinden ayırt edilmesinde genotipik yöntemler 'referans yöntem' olmaya devam etmektedir. Bu yöntemler ile karbapenemaz grubu, dizi analizleriyle karbapenemaz geninin hangi varyantı olduğu da tespit edilebilir (81).

Moleküler tanı yöntemlerinde etkenin nükleik asitlerini saptamak amacıyla nükleik asit hibridizasyonu kullanılmaktadır. Hibridizasyon teknikleriyle araştırılan materyalde bir nükleik asit molekülü ısı ya da çeşitli kimyasal

maddeler ile ayrıştırılır, nükleik asit zincirleri üzerindeki özgül genlerin varlığını nükleik asit problemleri işaretlenerek gösterilir. İşaretlenen hedef nükleik asit örnekte çok az miktarda bulunuyorsa hibridizasyonla tespit edilemez. PCR yöntemi ile örnekte çok az miktarda bulunan nükleik asitleri çoğaltmak (amplifikasyon) ve sonra uygulanacak hibridizasyon ile tespit edilebilir düzeye getirmek mümkündür. PCR, patojen bakterilere ait hedef nükleik asit zincirleri, primer adı verilen özgül komplementer oligonükleotidleri, ısıya dayanıklı polimeraz enzimleri (*Thermus aquaticus*/Taq polimeraz) ve programlı biçimde ısının süratle alçaltılıp yükseltildiği ‘thermocycler’ cihazları kullanılarak in vitro olarak amplifikasyonunu sağlayan bir tekniktir ve üç-dört saat sonunda zincir kopya sayısı milyonlarla ifade edilen düzeye gelmektedir (81).

Tekli PCR, multipleks PCR ya da gerçek zamanlı PCR uygulamaları ile rahatlıkla karbapenemaz genleri tespit edilebilir. Koloniler üzerine direkt olarak uygulanan bir PCR tekniği ile mükemmel özgüllük ve duyarlılığa sahip sonuçlar 4-6 saat içerisinde elde edilebilir. Real-Time PCR teknolojisi kullanılması halinde daha kısa sürede gerçekleştirilebilir (67). Multipleks PCR da aynı tüpe farklı hedefler için özgül olan iki veya daha fazla primerin konularak aynı anda çok sayıda hedef dizinin amplifiye edilebilmektedir (82).

Direkt Hibridizasyon Testleri: Hibridize edilmiş nükleik asit problemlerinin tespit edilmesi temeline dayanır. Sıvı fazlı sistemde çözünebilen hedef DNA molekülleri tek sarmallı RNA problemlerine bağlanır. Meydana gelen DNA-RNA hibridleri, hibride özgül antikorlar olan bağlayıcılar tarafından yakalanır. Tespit işlemi için sandviç ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) kullanılır. Anti-hibrid antikorları sonra substrat eklenir. Kemoluminesan tespit işlemi yürütülür. Bu testte amplifikasyon düzeyleri daha az duyarlı olmakla birlikte, kullanımı kolay, çapraz kontaminasyon riski düşüktür (82).

Ticari olarak satılan PCR kitlerinden Check-MDR CT102 DNA microarray gibi bazı kitler tek bir test tüpünde birçok gen saptayabilmektedir (83). Bir çalışmada, bu sistemle KPC, NDM, VIM, OXA-48 ve VIM+KPC üreten ve meropenem MİK değerleri $\geq 0,5$ mg/L olan enterobakterilerde % 100 özgüllük ve % 97 duyarlılıkla saptandığı yayınlanmıştır (84). Diğer bir kit olan Hyplex-MBL ID Multiplex PCR-ELISA ise karbapenemaz gen amplifikasyonunu ELISA ile

tespit etmektedir. DNA multipleks PCR aracılığıyla amplifiye edildikten sonra ELISA plaklarına sabitlenir. Sonra özgül oligonükleotid problemleri ile hibridize edilir ve oluşan bileşikler peroksidaz işaretli konjuge antikorlar aracılığıyla renk değişimi şeklinde saptanır (83). Bir çalışmada, bu metodla VIM üreten *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *Enterobacteriaceae spp.* izolatlarında % 98,6 özgüllük ve % 98 duyarlılıkla saptandığı yayınlanmıştır (85).

Moleküler tabanlı teknolojilerin temel dezavantajları yüksek maliyetleri, eğitilmiş teknisyene ihtiyaç duyulması ve nadir genlerin tespit edilmesinde yetersiz olmasıdır. Genlerin sıralaması çoğunlukla araştırma ve epidemiyolojik amaçlarla ilgilidir. Karbapenemaz tipinin kesin olarak tanımlanması ne hasta tedavisi açısından ne de salgınları önlemek açısından şu an ihtiyaç bulunmamaktadır (18). Karbapenemaz kodlayan genlerdeki yüksek çeşitlilik ve artan sayıdaki yeni varyantlar nedeniyle karbapenem dirençli bir suşta elde edilen negatif PCR sonucu, bir referans laboratuvarında ek genotipik analizlerle yeniden değerlendirilmelidir (74).

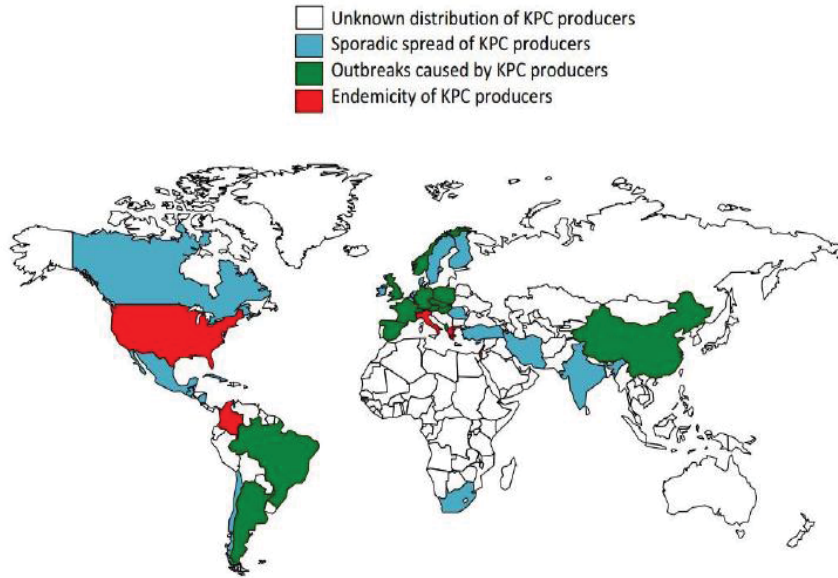
Tablo 2.13 Karbapenem dirençli mikroorganizmalarla kolonizasyon/infeksiyona yönelik bağımsız risk faktörleri:

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none">- Üreme tespit edilmeden altı ay öncesinde en az bir kez hastane yatışının olması- Yoğun bakımda yatış hikayesi olması- Hastanede yatış süresinin uzunluğu- Son 30 gün içinde β-laktam grubu antibiyotik kullanımı- Karbapenem kullanımı- İntravasküler veya cerrahi drenaj kateteri (biliyer drenaj, apse drenajı) varlığı- Mekanik ventilasyon- Hematolojik malignite veya organ nakli gibi immünsüpresif hastalık olması- Diabetes mellitus- İleri yaş- Üremi- Kronik karaciğer hastalığı olması |
|---|

2.3.6 Karbapenemaz epidemiyolojisi

Karbapenem direnci ilk olarak 1988 de Japonya'da *P. aeruginosa*'da saptanmıştır (59). Sonra 1998 de *K. pneumoniae*'da, 1998-2000 arasında *C. youngae* suşlarında tespit edilmiştir. Bu tarihten itibaren birçok ülkeden karbapenem direnci bildirilmiştir (86).

KPC 1996 da ABD'nin Kuzey Karolina eyaletinde yapılan Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology surveyans çalışmasıyla bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. KPC β -laktamazlar çoğunlukla *K. pneumoniae*'da olmak üzere *E. coli*, *Enterobacter* ve *Salmonella* türlerinde de tespit edilmiştir (2). KPC dünya genelinde ilerleyici bir biçimde yayılmış ve KPC üreten *K. pneumoniae* ile hastane salgınları bildirilmiştir. Özellikle son yıllarda Avrupada bu blaKPC geninin hızlı plazmidik şekilde yayılımı kaygıları arttırmakta ve ilgi uyandırmaktadır (87).

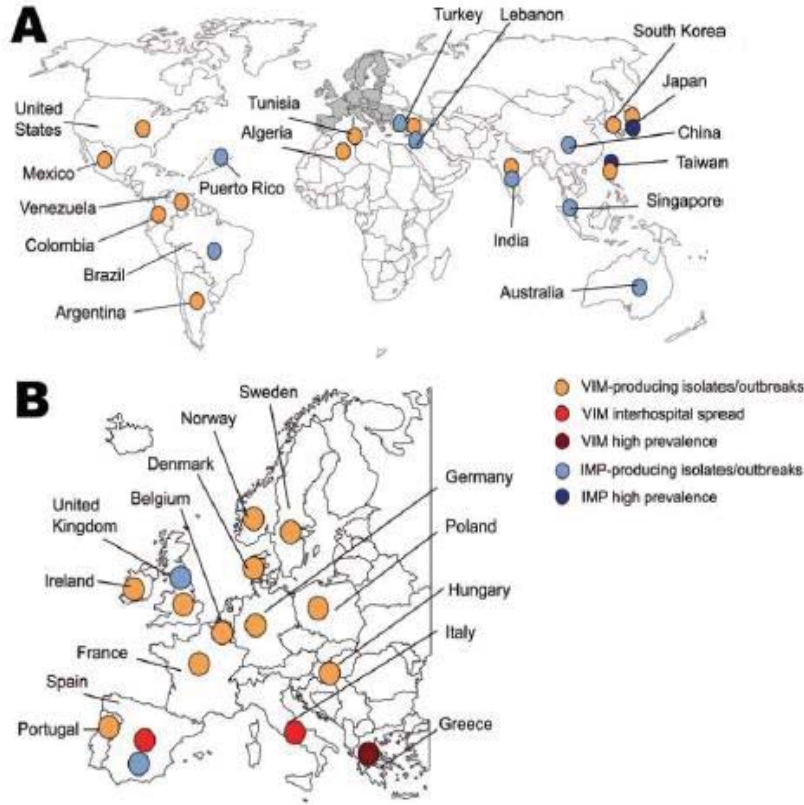


Şekil 2.6. KPC üreten suşların coğrafik dağılımı (88)

Sık görülen MBL enzimleri (VIM, IMP, SIM, GIM...) içerisinde dünyada en sık saptanan VIM-2 dir (2). Avrupada ise VIM ve KPC en sık tespit edilen karbapenemazlardır. VIM-2 ilk kez 1996 da Fransa'da bir *P.aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir. BlaVIM veya blaKPC içeren *K. pneumoniae* suşları Yunanistan, İsrail, ABD, birkaç Latin Amerika ülkesi ve Çin'de ülke genelinde

epidemilerine neden olmuştur. Bu suşlar hastaneler arası transfer edilen hastalar ile taşındığı zaman yayılımlar görülmüştür (89). İtalya’da 2002’de yapılan bir çalışmada, VIM-1 enzimi üreten *Pseudomonas putida* izolatlarının hastane enfeksiyonuna yol açtığı saptanmıştır. Bu bulgu, MBL’in çevre kaynaklı olabileceği ya da *P. putida*’nın MBL için bir vektör olabileceği olasılığını gündeme getirmiştir (64).

Türkiye’de ise VIM-1 (*K. pneumoniae*), VIM-2 (*P. aeruginosa*), VIM-5 ve IMP-1 (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* ve *P. aeruginosa*) MBL tespit edilmiştir (90,91).

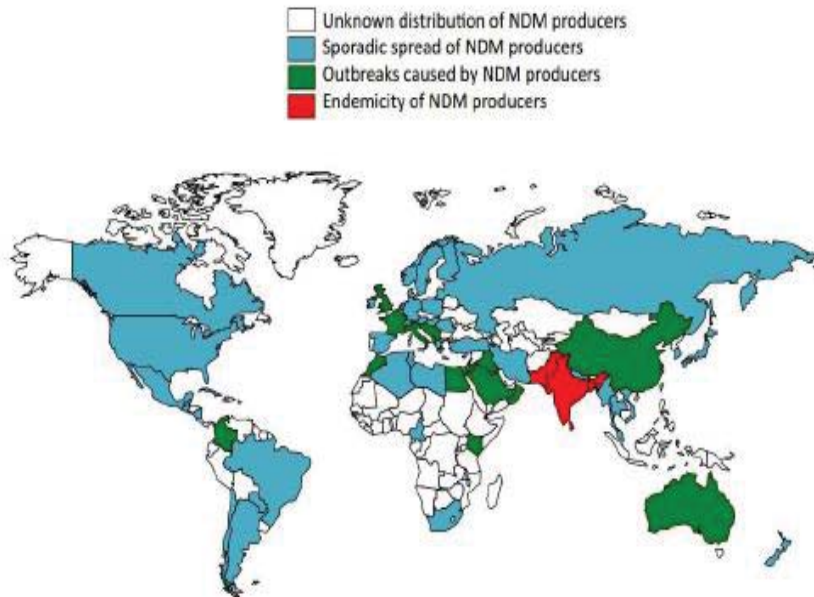


Şekil 2.7. IMP ve VIM üreten suşların coğrafik dağılımı (79)

2008’ de NDM-1 tipi direnç *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında kıtalar arası yayılım göstermiş ve pandemiye neden olmuştur. Aynı yıl Hindistan’da bir hastanede tedaviden sonra İsveç’e geri dönen bir hastadan elde edilen birer *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında NDM-1 tanımlanmıştır. Birleşik Krallıktaki tespit edilen NDM-1 pozitif hastaların çoğunun da Hindistan veya Pakistan’a

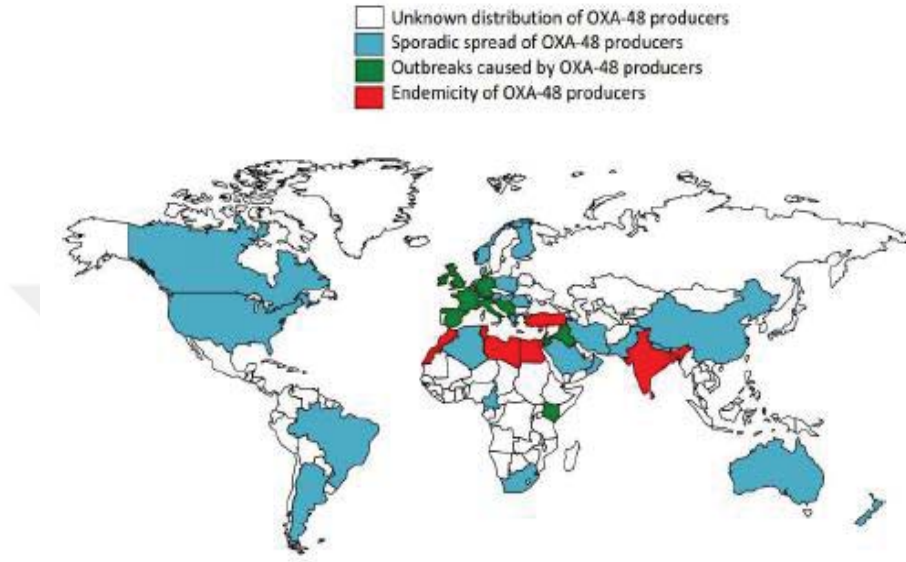
seyahat öyküsü olduğu bildirilmiştir. Hastaların çoğu buralarda elektif cerrahi ve renal diyalizi içeren çeşitli endikasyonlarda hastanelerde yatmışlardı (62). İngiltere’de saptanan NDM-1 *E. coli* suşlarının Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) profili ile Hindistan’dan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarına benzer olduğu saptanmıştır. PFGE neticesinde tek bir profilin üyesi olmaları klonal yayılımı düşündürmüş dolayısıyla plazmidler vasıtasıyla iletilebilen direnç mekanizmalarının uluslararası yayılımı korkutucu bir toplumsal tehdit meydana getirebileceğini ortaya koymuştur (87). Hindistan’daki NDM-1 üreten *Enterobacteriaceae*’ların çoğu toplumdan kazanılmıştır. *Enterobacteriaceae*’lar içinde en sık kaynak *E. coli* ve *K. pneumoniae*’da tespit edilmesine karşın *K. oxytoca*, *C. freundii*, *E. cloacae*, *M. organii*, *Proteus spp.* ve *Providencia spp.* de de NDM-1 kaydedilmiştir (62). NDM-1 i Türkiye de ilk defa Poirel ve ark. tarafından bir lösemi hastasının kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* suşunda bildirilmiştir (92).

BlaNDM-1 karbapenamaz üreten genleri içeren *Enterobacteriaceae*’ların dünya genelinde yayılımı halk sağlığı için önemli bir tehdittir. Çünkü yoğun antibiyotik direncine ve tedavi seçenekleri kısıtlanmasına neden olmaktadır. Sonuç olarak karbapenamaz üreten *Enterobacteriaceae*’lar ile enfekte hastalarda ölüm ve komplikasyon riski artmıştır. (62).



Şekil 2.8. NDM üreten suşların coğrafik dağılımı (88)

Nozokomiyal patojen enterobakterilerde sınıf D OXA direnci nadir değildir. Genelde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. ve enterobakterilerde tespiti edilirler. Türkiye OXA-48 enzimi için endemik kabul edilen ve bu enzimi taşıyan kökenlerin toplum içerisinde sirkülasyona girdiği belirtilen bir ülkedir (88).

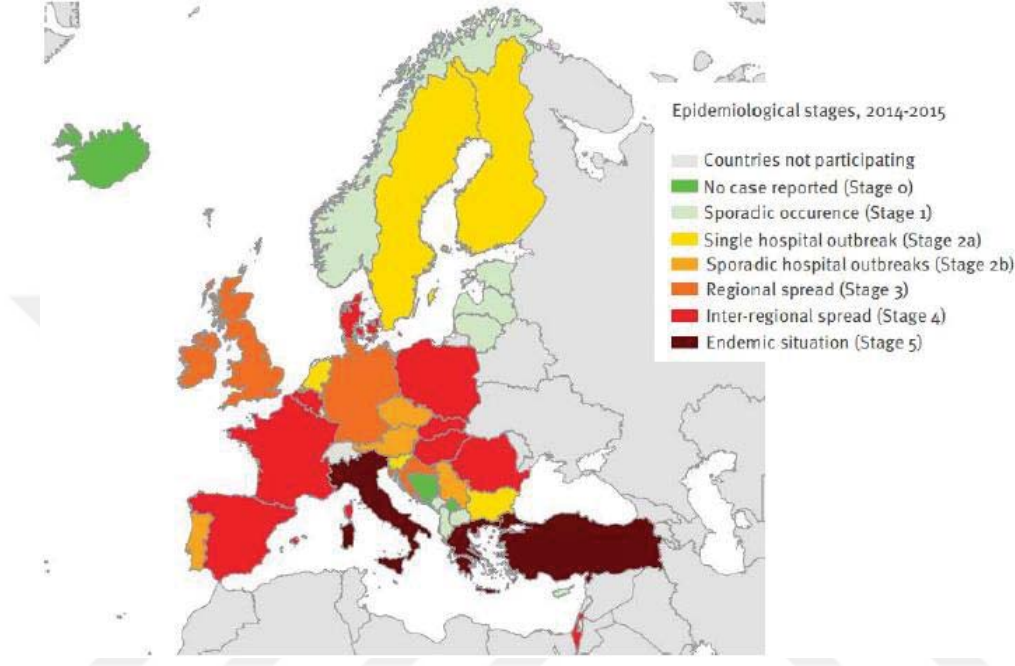


Şekil 2.9. OXA-48 üreten suşların coğrafik dağılımı (88)

Mart 2009 da CDC (Center for disease Control and Prevention) tarafından *Enterobacteriaceae*'ların kontrolü için gereken önlemler yayınlanmış ve tüm bakım hastanelerinde uygulanması istenen tedbirler şunlardır (93):

- Karbapenem dirençli izolatların laboratuvarda tespit edilebilmesi için CLSI kılavuzlarına uyulmalıdır.
- Her hastane bir önceki 6-12 aylık döneme ait laboratuvar raporlarını karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* saptanıp saptanmadığına yönelik incelemeli, eğer karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* suşu tespit edilmiş ise yüksek riskli ünitelerde yatan hastalardan sürveyans kültürü alınarak bir nokta prevalans çalışması yapılmalı ve yeni vakaların varlığı araştırılmalıdır. Yeni vaka tespit edilmesi durumunda periyodik olarak aktif sürveyansa devam edilmelidir.
- Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ile kolonize veya infekte hastalar temas izolasyonuna alınmalıdır.

Literatürde aktif sürveyans, izolasyon önlemleri, eğitim, antibiyotik kullanım politikalarının gözden geçirilmesi, kohort uygulaması, ortam temizliği-dezenfeksiyonu programlarıyla hastanelerde çoğul dirençli bakterilerin kontrolünde başarılı sonuçlar elde edildiği belirtilmiştir (80).



Şekil 2.10. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatları için Avrupadaki durum (94)

Tablo 2.14 Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*, Avrupa ülkelerinde karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durum: 2014- 2015 (94)

Ülkeler	KPC	OXA-48	VIM	NDM	IMP	Ülkeler	KPC	OXA-48	VIM	NDM	IMP
Almanya	2	3	1	2	1	İspanya	3	4	4	2	1
Avusturya	2	1	2	1	0	İsveç	1	2	1	1	1
Belçika	4	4	3	3	0	İtalya	5	3	4	1	0
Birleşik Krallık	4	2	2	2	0	Kıbrıs	1	1	0	0	0
Bulgaristan	2	1	1	2	0	Macaristan	1	2	4	1	0
Çek Cumhuriyeti	2	1	2	1	0	Norveç	1	1	1	1	1
Danimarka	1	1	0	4	0	Portekiz	2	1	1	2	0
Finlandiya	2	1	1	1	1	Sırbistan	1	2	0	2	0
Fransa	2	4	2	3	1	Slovakya	4	0	1	1	0
Hırvatistan	2	3	2	2	1	Slovenya	1	2	1	2	0
Hollanda	2	2	2	1	1	<u>Türkiye</u>	<u>0</u>	<u>5</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>1</u>
İrlanda	3	3	1	2	1	Yunanistan	5	1	5	3	0

0 (Düzey 0): Rapor edilen vaka yok,
1 (Düzey 1): Sporadik vakalar rapor edilmiş,
2 (Düzey 2): Hastane salgını ya da salgınları rapor edilmiş,
3 (Düzey 3): Bölgesel yayılım rapor edilmiş,

4 (Düzey 4): Bölgeler arası yayılım rapor edilmiş,
5 (Düzey 5): Endemik durum

Tablo 2.15. Türkiye’de karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*

Gen	İzolasyon tarihi	Referans
OXA-48	Eylül 2001	Poirel L ve ark. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Antimicrob Agent Chemother 2004;48(1):15-22
IMP-1	2000-2004	Deshpande LM ve ark. Occurance and Characterization of Carbapenemase-Producing <i>Enterobacteriaceae</i> : Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004) Microbial Drug Resistance 2006;12(4):223-230
NDM-1	Ekim 2011	Poirel L ve ark. NDM-1 Producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> Now in Turkey. Antimicrob Agent Chemother 2012;56(5):2784-2785
OXA-48 + NDM-1	Şubat2010-Aralık 2011	Alp E ve ark. Molecular characterization of carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> in a tertiary university in Turkey. Journal of Hospital Infection 2013;84:178-180
KPC-2	2011	Jones RN ve ark. Resistance surveillance program report for selected European nations (2011). Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 2014;78:429-436
VIM-5	Şubat2011-Mart 2013	Balkan II ve ark. Blood stream infections due to OXA-48 like carbapenemase-producing <i>Enterobacteriaceae</i> : treatment and survival International Journal of Infectious Diseases 2014;26:51-56

2.3.7 Genişlemiş Spektrumlu β -laktamazlar

1980'lerde kullanıma giren 'geniş spektrumlu' sefalosporinler enfeksiyonların tedavisinde yaygın kullanılmışlardır. Buna karşılık bakteriler maruz kaldıkları antibiyotiklere karşı hidroliz etkinliği olan enzimler üretmeye başlamıştır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin inaktivasyonuna yol açan bu β -laktamazlar "genişlemiş spektrumlu" ön adıyla isimlendirilmiştir (95).

Malignite, immünsüpresif hastalıklar gibi altta yatan hastalıklar, ileri yaş, kadın cinsiyet, uzun süreli hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde yatış, önceden aminopenisilin, sefalosporin, florokinolon kullanmış olma, santral venöz, arteriyel ve üriner kateter bulunması, mekanik ventilasyon bu bakterilere bağlı enfeksiyonların gelişmesi için başlıca risk faktörleridir (32).

İlk 1983'te Almanya'da bir yoğun bakım ünitesinde izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunun oksimino-sefalosporinlere karşı direnç geliştirebildiğini ve bu direnç genini de transfer edilebildiği bildirilmiştir (96). 1983' ten günümüze kadar geçen zamanda tüm dünyada tespit edilmiştir. Bu yayılım; klonal çoğalma, plamid ile aktarım ve yeni nadir enzimlerin ortaya çıkmasının sonucudur. Ülkemizde ise GSBL'ler 1992 yılından beri bildirilmektedir (97).

Ambler moleküler sınıflamasında grup A ve D, Bush fonksiyonel sınıflamasında grup 2be, 2ber, 2de, 2e'de yer alan GSBL ler, plazmid kontrolündeki enzimlerin en büyük grubunu meydana getirmektedirler. En sık CTX-M, TEM ve SHV enzim tipleri tespit edilmektedir. TEM ve SHV daha çok nozokomiyal enfeksiyonlarda, CTX-M ise daha çok toplum kökenli enfeksiyonlarda saptanmıştır (96). Klasik GSBL'ler olarak sayılan TEM ve SHV türevi enzimler; penisilinleri, aztreonamı, birinci kuşak ve oksimino sefalosporinleri hidrolize uğratırlar. Bu enzimler β -laktamaz inhibitörlerine ve sefamisin sefalosporinlerine karşı etkisi yoktur. Sefamisinlere etkisiz olmaları GSBL'leri AmpC tipi β -laktamazlardan ayıran özelliklerdendir (95).

GSBL'ler *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık *K.pneumoniae* ve *E.coli* de tespit edilmektedir (98).

TEM Kökenli GSBL'ler: Gram negatiflerde en yaygın bulunan β -laktamazdır. Direnç gelişiminde enzimin aktif bölgesinde bir aminoasidin konfigürasyon değişikliği sorumludur. İlk TEM türevi 1988 de bildirilmiştir. Günümüze kadar 180 den fazla TEM grubu enzim saptanmıştır (99). Plazmid kökenli enzim olan TEM-1 ampisiline dirençli *E. coli*'lerin % 90'ında dirençten sorumludur (100). TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanır. Bu enzimlerin bir kısmı 'inhibitör dirençli' TEM türevi olup GSS inhibisyonu yapamadıklarından dolayı gerçek anlamda GSBL olarak kabul edilmez. Bu grup GSBL'ler sıklıkla *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*, *Proteus* ve *Salmonella* türlerinde bulunabilir (99).

SHV Kökenli GSBL'ler: Sıklıkla kromozomal bir enzimdir. Avrupa ve Amerika'da SHV tip GSBL'lerin hakim olduğu bildirilmektedir. SHV-5 ve SHV-12 bu grubun içinde en yaygın görülenleridir (100). Plazmid aracılığıyla gelişen ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumludur. SHV-10, SHV-49 ve SHV-56 'inhibitör dirençli' özellik göstermektedir. Bu grup GSBL'ler ek olarak en sık *K. pneumoniae*'da olmak üzere *Citrobacter diversus* ve *E. coli* de bulunabilir (99).

CTX-M kökenli GSBL'ler: İsimden de anlaşılacağı üzere sefotaksime karşı diğer oksimino β -laktam grubu antibiyotiklere oranla daha fazla aktivite gösteren enzimlerdir. CTX-M türü β -laktamazlar, bir mutasyonel değişiklikten ziyade, kommensal bakteri olan *Kluyvera*'nın kromozomundaki bir β -laktamaz genini içeren plazmidin alınması sonucu ortaya çıkar (61).

PER Grubu GSBL'ler: İlk Fransa'da Türk bir hastadan elde edilen *P. aeruginosa* da bulunmuştur (101). Hacettepe Üniversitesi'nde izole edilen 14 *P. aeruginosa* izolatlarında plazmid kontrolünde bir enzim olduğu gösterilmiştir (102). Penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize eder, klavulanat inhibe olur (98).

OXA Grubu GSBL'ler: TEM ve SHV deki gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonlar neticesinde ampisilin, birinci kuşak sefalosporinlere ve oksasiline direnç, oksimino-sefalosporinlere ise zayıf direnç gösterirler (103). Genelde klavulanat ile inhibe olmaz veya çok düşük düzeyde inhibe olurlar (58). Diğer GSBL'lerden farklı olarak bu enzimler seftazidime yüksek düzeyde dirence

neden olurlar (102). Bu enzim genlerinin büyük bir kısmı transpozon, plazmid veya integron kontrolündedir (58). İlk olarak Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yatan bir hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (102). OXA enzimleri içinde yer alan bazı enzimler karbapenemaz aktivitesi göstermektedir ki bunlar GSBL değildirler (100).

İnhibitör Dirençli GSBL'ler (IRT): Bu grup GSBL olmadığı halde, TEM veya SHV tipi enzim türevidir olduklarından dolayı tartışılmaktadır. Genelde *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* ve *C. freundii*'nin suşlarında saptanmışlardır. İnhibitör dirençli TEM varyantları klavulanat ve sulbaktamın inhibisyonuna dirençli olmalarına rağmen tazobaktam tarafından inhibe olabilmektedirler (46). Üçüncü kuşak sefalosporinleri hidroliz etmemektedir (100). İnhibitör dirençli SHV varyantları ise düşük düzeyde β -laktamaz inhibitörlerine ve yüksek düzeyde GSS lere direnç gösterir (45).

Diğer GSBL'ler: VEB-1-2, GES-1-2, BES gibi bildirilmiştir (11).

2.3.8 Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz aktivitesinin saptanması

Disk-difüzyon tarama testi: CLSI tarafından GSBL üreten gram negatiflerin taraması amacıyla önerilmektedir. Test edilecek bakteri 0,5 McFarland standardına göre hazırlanır. MHA ekimi yapılır. Üçüncü kuşak sefalosporin veya aztreonam diskleri yerleştirilir. 35°C'de 24 saat inkübasyondan sonra zon çapları ölçülür. Testte göre şüpheli olan suşlarda GSBL varlığı fenotipik doğrulama yöntemlerinden biri kullanılarak araştırılır (104).

GSBL üreten bakteriler için CLSI tarafından son öneri, yeni sınır değerler uygulandığında GSBL'nin rutin olarak araştırılmaması ve bildirilmemesidir. Epidemiyolojik amaçlarla laboratuvar GSBL araştırmaya devam edebilir (105).

Tablo 2.16. *Enterobacteriaceae* için GSBL tarama testleri için kullanılan antibiyotikler, disk içerikleri, zon çapları ve MİK değerleri (69, 106)

Antibiyotik	CLSI			EUCAST		
	Disk Difüzyon		Sıvı veya Agar dilüsyon	Disk Difüzyon		Sıvı veya Agar dilüsyon
	Disk içeriği	Zon çapı (mm)	MİK	Disk içeriği	Zon çapı (mm)	MİK
Sefpodoksim	10 µg	≤17	≥4 µg/ml	10 µg	<21	>1 µg/ml
Seftazidim	30 µg	≤22	≥1 µg/ml	10 µg	<22	>1 µg/ml
Aztreonam	30 µg	≤27	≥1 µg/ml	-	-	-
Sefotaksim	30 µg	≤27	≥1 µg/ml	5 µg	<21	>1 µg/ml
Seftriakson	30 µg	≤25	≥1 µg/ml	30 µg	<23	-

GSBL doğrulama testleri

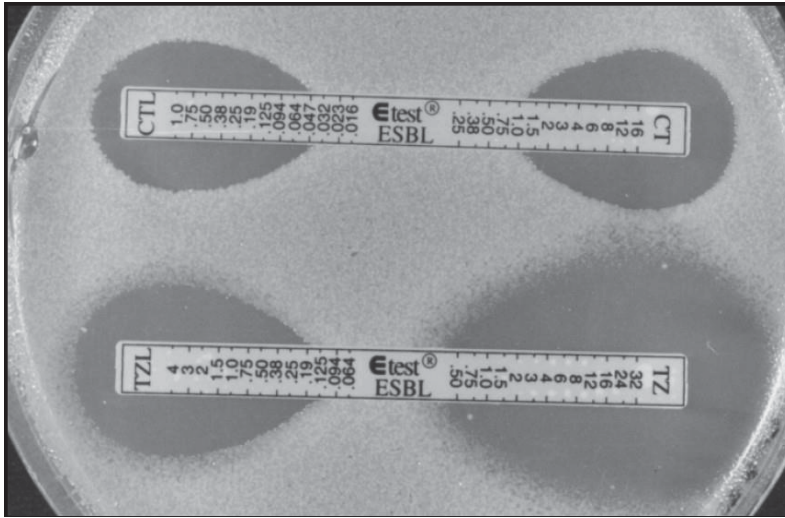
1. Çift disk sinerji testi; McFarland 0,5 standardına göre hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA ekimi yapılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanat (AMC) diski (20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim (30 µg), seftriakson (30 µg) veya sefotaksim (30 µg), aztreonam (30 µg) veya sefpodoksim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35 °C’de inkübasyondan sonra sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun klavulanat sinerjisi ile AMC diskiye doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (107).

2. Kombine disk yöntemi; Sefotaksim (30µg) veya seftazidim (30µg) disklerine 10 µg klavulanat eklenir. McFarland 0,5 standardına göre hazırlanan bakteri süspansiyonunun MHA ekilir. Plaklara klavulanat (30µg) içeren ve içermeyen sefotaksim ve seftazidim diskleri yerleştirilir. Bir gece 35°C’de inkübasyondan sonra klavulanat içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla ≥ 5 mm daha genişse izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (107).

3. Mikrodilüsyon yöntemi; Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanat varlığında saptanır. Klavulanat varlığında MİK değerlerinde $\geq 3 \log 2$ (8 kat) azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (107).

4. Otomatize Vitek sistemleri; MİK leri ölçer. Seftazidim varlığındaki üreme ile seftazidim-klavulanik asit varlığındaki üremeyi kıyaslar (104).

5. E-test yöntemi; Test stripleri bir ucunda seftazidim (TZ), diğer ucunda seftazidim ve klavulanat (TZL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. TZ ve TZL MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulanat (CT-CTL) içeren E-test stripleri de bulunmaktadır. Özellikle CT-CTL striplerinde klavulanatın diğer tarafa da difüze olması nedeniyle stripin ortasında bir “fantom zon” görülebilmektedir. Bu zon GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (Şekil 4) (107).



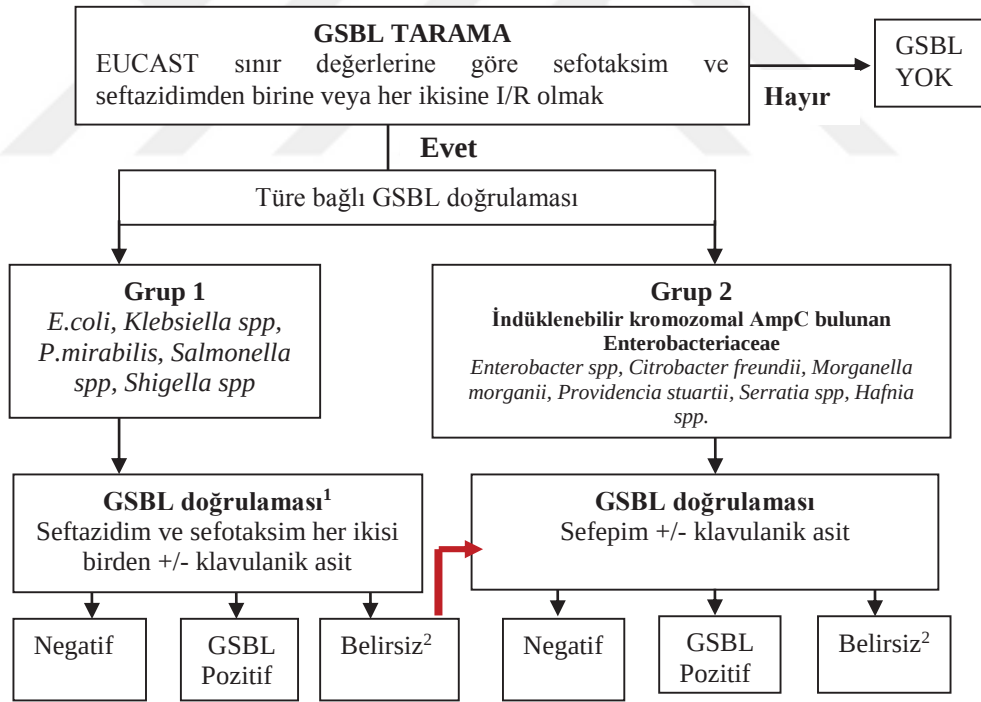
Şekil 2.11. E-test yöntemi ile GSBL tayini.

(Sol) GSBL üretmeyen bir suş. (Sağ) GSBL üreten bir suşun seftazidim MİK >256 mg/mL iken, seftazidim/klavulanik asit MİK değerinin ≥ 8 kat azaldığı görülmekte (107).

6. MİK broth dilüsyon yöntemi; Tek başına ve klavulanat ile kombine üçüncü kuşak sefalosporinlerin MİK'leri saptanır. Klavulanatın besiyerine eklenmesiyle MİK değerinde 3 kat artış görülmesi GSBL varlığını gösterir (104).

7. Moleküler yöntemler; GSBL lerin rutin tanısında değil epidemiyolojik araştırmalarında tercih edilmelidirler. DNA problemleri, PCR, oligotiplendirme, PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analizi, PCR-Single Strand Conformation Polymorphism analizi, ligaz zincir reaksiyonu ve nükleotid analizi kullanılır. Nükleotid dizi analizi çok emek gerektiren, teknik olarak zor ama altın standarttır. Tüm türevleri saptayabilmektedir (100).

Doğrulama testleri GSBL üreten izolatların AmpC tipi β -laktamaz üreten izolatların ayırımında önemlidir. AmpC tipi β -laktamazlar, β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler ve sefoksitin direncine yol açarlar (107).



¹Eğer sefoksitin MİK > 8 mg/L, sefepim +/-klavulanik asit doğrulama testi yapınız

²Pozitif veya negatif olarak değerlendirilemeyen grup (ör. Kapsadığı MİK düzeylerinin üzerinde üreme olması nedeniyle, gradiyent striplerin okunamaması)

Şekil 2.12. GSBL'lerin fenotipik yöntemlerle saptanması için akış şeması (69)

2.3.9 GSBL Epidemiyolojisi

Ülkemizde ve dünyada yaygın olarak bulunan GSBL lerin bugün için bilinen 200 den fazla enzim tipi tanımlanmıştır. GSBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri hastane ve toplum kökenli enfeksiyonlara sıklıkla yol açmaktadır. Dağılımları ülkeden ülkeye ve hastaneden hastaneye değişmektedir (103). Türkiye’de de, hastane izolatlarında GSBL sıklığının merkezler arasında farklılıklar gösterdiği ve % 45-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (108). Türkiye, Avrupa ülkeleri kıyaslandığında en yüksek GSBL prevalansına sahip ilk üç ülke arasında yer almaktadır (109).

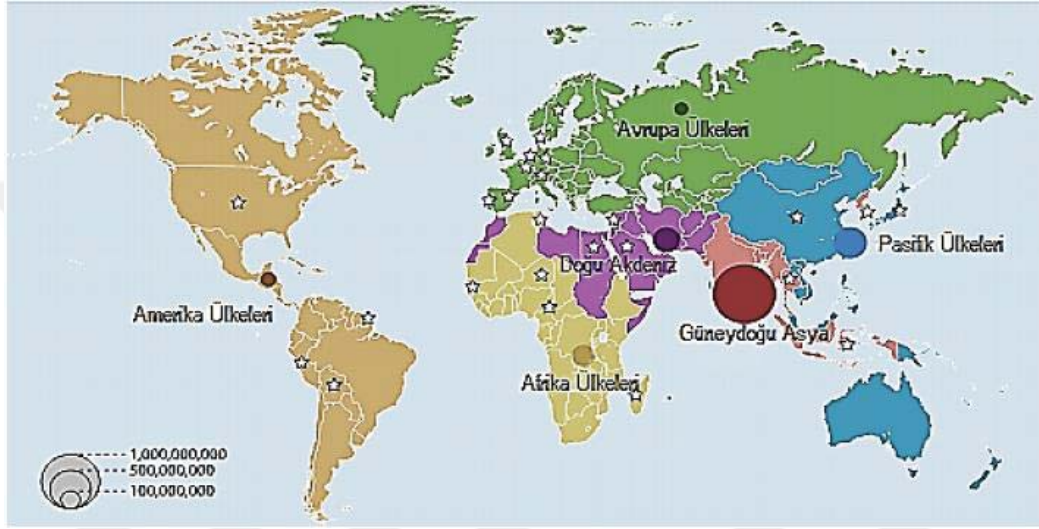
Dünyanın birçok yerinde *E.coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında GSBL üretme oranı %10-40 arasında, ülkemizde ise %11-86,6 arasında değişmektedir (98).

Toplumsal kaynaklı GSBL-pozitif enterobakterilerin başlıca yayılış yolları fekal bulaşma ve uluslararası seyahat ağlarıdır (110). Yapılan bir araştırmada Türkiye, Bahreyn, Irak, İsrail, Yemen, Ürdün, Katar, Lübnan, Umman, Filistin, Suudi Arabistan, Suriye, Birleşik Arap Emirlikleri ve Kıbrıs’a seyahat eden Federal Almanya Cumhuriyeti vatandaşlarının %11’inin GSBL üreten *E. coli* ile infekte ve %5’inin ise bu dirençli bakteri tipi ile kolonize oldukları saptanmıştır (111).

GSBL enzimlerini kodlayan plazmidler ek olarak birçok β -laktam dışı antibiyotiğe karşı da genetik materyal bulundurmaktadır. Bundan dolayı GSBL taşıyan bakterilerde başta aminoglikozidler olmak üzere kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim/sülfometaksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilmektedir. GSBL pozitif bir bakterinin ürettiği enzimin çeşitli sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi durumlardan dolayı üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görülebilmektedir. Bu durumda tercih edilen üçüncü kuşak sefalosporin ile tedavi başarısız olur (112).

GSBL pozitif bakteriyel enfeksiyonlarda komplikasyon riski ve mortalite oranı yüksektir. Özellikle uygunsuz antibiyotik kullanımı sağaltımda başarısızlığa, mortalitede artışa ve maddi kayıplara neden olmaktadır (113).

İzolasyon önlemleri, çevresel dekontaminasyon ve antibiyotik kullanım paternlerinde değişiklik gibi enfeksiyon kontrol önlemleri ile GSBL pozitif bakteriyel enfeksiyonları önlenabilir. Pek çok çalışmada hastane içinde geniş spektrumlu sefalosporin kullanımının kısıtlanmasının GSBL üreten bakteri enfeksiyonlarında azalmaya ve salgınların kontrol alınmasına katkıda bulunduğu gösterilmiştir (114).



Şekil 2.13: Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* taşıyıcı sayısı (110)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından, 10.06.2015 tarihinde, 70904504 sayılı 272 karar no ile onaylanmıştır. Proje çalışması, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı bünyesinde, Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında yapılmıştır.

3.2. Hastalar ve Örnekler

2010 – 2015 yılları arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi yataklı servislerinde takip edilen hastaların, kan kültürlerinden izole edilmiş, otomatize BD Phoenix 100 (Becton Dickinson and Company, ABD) sistemi ile karbapenemlerden biri veya birkaçına orta dirençli veya dirençli bulunan *Enterobacteriaceae* izolatları çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya alınan hastalara ait demografik bilgiler, mevcut risk faktörleri gibi veriler, antibiyotik duyarlılık sonuçları retrospektif olarak kaydedilmiştir (Ek 1). İzolatlar Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarında ticari kit ve in-house PCR uygulanmak üzere -80°C’de saklanmıştır.

3.3. Bakteriye Tanımlama ve Antibiyotik Duyarlılık Testi

Kan kültürü örnekleri, tam otomatik sistem olan BD BACTEC FX ve BD BACTEC 9240 cihazında inkübe edilmiş, üreme sinyalinin alınmasından sonra % 5 koyun kanlı agar (Becton Dickinson and Company, ABD) ve MacConkey agar (Becton Dickinson and Company, ABD) besiyerlerine pasajları yapılmıştır. Ekim yapılan plaklar 24- 48 saat 35°C’de inkübe edilmiştir. Konvansiyonel yöntemlerle *Enterobacteriaceae* olarak değerlendirilen bakterilerin tür tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri otomatize BD Phoenix 100 bakteri tanımlama sistemi ile yapılmış, suşlar gliserollü buyyonda stoklanarak PCR testleri yapılana kadar -80°C de saklanmıştır.

BD PHOENIX 100:

Gram negatif bakteriler için kullanımda olan BD Phoenix 100 NMIC paneli (Becton Dickinson and Company, ABD) inokülasyon yuvaları üst kısma gelecek şekilde inokülasyon istasyonuna yerleştirilmiş, saf bakteri kolonisinden BD Phoenix ID sıvısı (4,5 ml) içerisine aktarılıp BD PhoenixSpec ile 0,5 McFarland bulanıklık standardına eş değer bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. BD Phoenix AST (antibiyotik duyarlılık test) sıvısı içeren tüpe (8,0 ml) AST indikatörü solüsyonu eklenmesinin ardından bir pipet yardımıyla 25 µL standardize bakteri süspansiyonu ID tüpünden AST tüpüne aktarılmıştır. ID tüpünün tamamı panelin ID tarafındaki doldurma yuvasına, AST tüpünün tamamı ise panelin AST tarafındaki doldurma yuvasına boşaltıldıktan sonra panelin kapakları kapatılıp panel barkodu ve örnek numarası BD Phoenix 100 cihazına okutulduktan sonra cihaza yerleştirilmiştir. Bakteri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sonuçları 18 saat içerisinde elde edilmiştir.

3.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

BD MAX:

PCR çalışması için, tam otomatize BD Max sistemi ile çalışılan BD Max CRE (Becton Dickinson, ABD) multipleks moleküler tanı kiti kullanılmıştır. Bu sistem, çalışılacak materyalin cihaza yüklenmesinden sonra, sonuç çıkana kadar gerekli tüm işlemleri herhangi bir kullanıcı müdahalesine gerek duyulmadan gerçekleştiren bir sistemdir.

BD Max CRE kiti ilk olarak araştırma amaçlı üretilmiştir. Bu kit ile karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae kökenlerinde sık görülen üç farklı karbapenemaz direnç geni olan KPC, NDM ve OXA-48 saptanmaktadır. Hem klinik örneklerden hem de kültürde üreyen kolonilerden çalışılabilmektedir.

BD MAX Sistemi hedef organizma lizisi, DNA ekstraksiyonu ve konsantrasyonu dahil örnek hazırlanmasını, reaktif rehidrasyonu, hedef nükleik asit sekansının amplifikasyonu, gerçek zamanlı PCR kullanılarak gen saptanmasını ve sinyalin yorumlanmasını otomatik olarak gerçekleştirmektedir. Bu test, ayrıca ekstraksiyon tüpünde bulunan ve ekstraksiyon, konsantrasyon ve amplifikasyon adımlarına tabi olan bir internal kontrol içerir. İnternal kontrol,

potansiyel inhibitör maddelerin varlığını ve sistem veya reaktif arızalarını izlemek için lizis, ekstraksiyon, konsantrasyon ve amplifikasyon adımlarına dahil edilmiştir. Çalışma sonunda, BD MAX sistemi bilgisayar programı tarafından otomatik olarak, hedef ve internal kontrol amplifikasyonunu temel alarak, negatif, pozitif ve geçersiz sonuç olarak test sonuçlarını vermektedir.

BD MAX Sistemi, hücre lizisi ve DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için litik ve ekstraksiyon reaktiflerinin bir kombinasyonunu kullanır. Yüksek sıcaklıkta ısıtma ile enzimatik hücre lizisini takiben, salınan nükleik asitler manyetik afiniteli boncuklar tarafından yakalanır. Bağlanan nükleik asitli boncuklar yıkanır ve nükleik asitler elution Buffer'da ısı ile elüsyona tabi tutulur. Daha sonra, nötralizasyon tampon ile primer/problar yeniden su haline getirilir. Elüsyona tabi tutulan DNA, primer/problara (Nötralizasyon tamponu içeren) gönderilir. Primer /prob tüpünün içeriği daha sonra PCR reaktiflerini yeniden su haline getirmek için Master Mix tüpüne aktarılır. Bu amplifikasyon reaktifi, BD MAX PCR kartuşuna dağıtılır. Buharlaşıma ve amplikon kontaminasyonunu önlemek için PCR başlatılmadan önce BD MAX PCR kartuşundaki mikro valfler sistem tarafından kapatılır.

Amplifiye edilen DNA hedefleri, bir uçta bir floresan raportör boyası (fluorofor), diğer ucunda söndürücü (quencher) bir kısım ile etiketlenmiş hidroliz (TaqMan) problemleri ile tespit edilir. Farklı floroforlarla etiketlenmiş olan bu problemler, blaKPC, blaOXA-48, blaNDM genleri ve SPC amplikonlarını saptamak için kullanılır.

BD MAX Sisteminin farklı optik kanalları bulunmaktadır: blaOXA-48 amplikonları FAM kanalında (475/520 nm), blaKPC amplikonları ROX kanalında (585/630 nm), blaNDM amplikonları VIC kanalında (530/565 nm) ve SPC amplikonları Cy5.5 kanalında (680/715 nm) tespit edilmektedir. Problemler kendi doğal halindeyken, floroforun floresan söndürücüye yakın olması nedeniyle söndürülür. Bununla birlikte, hedef DNA varlığında, bu problemler kendi tamamlayıcı sekanslarına hibridize olur ve DNA kalıbı boyunca yeni oluşan diziyi sentezleyen DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ile floroforlar hidrolize edilir. Sonuç olarak, floroforlar söndürücü moleküllerden ayrılır ve floresan yayılır. BD MAX CRE Testi için kullanılan dört optik kanalda tespit edilen

floresans miktarı, hidrolize olan ilgili probun miktarı ile doğru orantılıdır. BD MAX Sistemi, bu sinyalleri her bir amplifikasyon döngüsünün sonunda ölçer ve sonuçları sağlamak için verileri yorumlar.

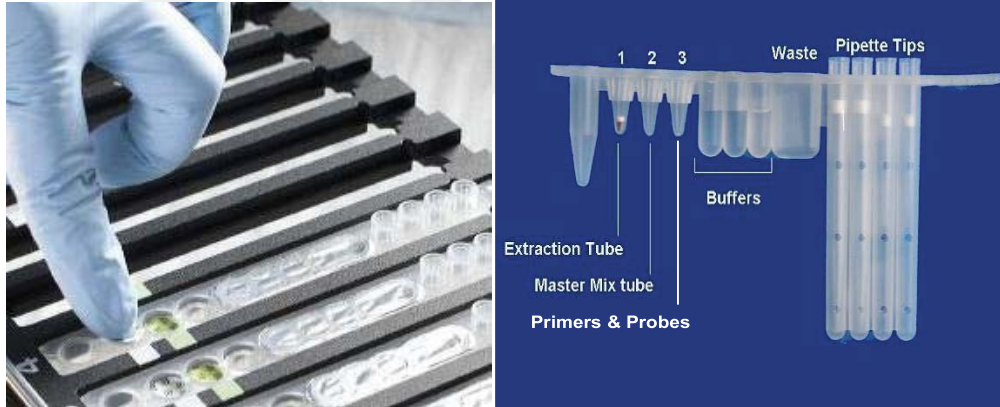
Kit içeriği:

Malzeme	İçerik
BD Max DNA Master Mix (SPC)	Polimeraz, nükleotidler ve örnek işleme kontrolüne özgü spesifik primer ve problemleri içeren kurutulmuş PCR Master Mix,
BD Max DNA reagen stripleri	Numune işleme ve DNA ekstraksiyonu için gerekli tüm sıvı reagenleri ve tek kullanımlık pipet uçlarını içeren reagen şeritleri.
BD Max Ekstraksiyon tüpü	DNA manyetik afinite boncukları, Proteinaz K ve örnek İşleme Kontrolü içeren kurutulmuş ekstraksiyon reajeni
BD Max CRE primer ve problemleri	Kurutulmuş KPC, NDM, OXA spesifik moleküler primer ve problemler
BD Max CRE sample buffer tüp	25 tüp kapağı ile

Örnek hazırlama ve BD Max Sisteminde testin yapılması;

- Çalışılacak bakteri izolatu, taze pasajdan serum fizyolojik içine 0.5 McFarland ($\sim 1.0 \times 10^8$ CFU/mL) bulanıklıkta olacak şekilde bakteri süspansiyonu halinde hazırlanmalıdır. Ardışık olarak $\sim 1.0 \times 10^4$ CFU/mL final konsantrasyonu elde edilene kadar serum fizyolojik ile dilüe edilmelidir.
- Dilüe bakteri süspansiyonu içine bir swab daldırılır. Bu swab uygun örnek kimliklemesi yapılmış sample buffer tüpüne eklenir, yaklaşık bir cm tüpten yukarı çıkarılıp çubuk kısmını tüpün kenarına doğru bükerek swab kırılır ya da steril bir makas ile kesilir. Sample buffer tüp kapağı kapatılır. Sample buffer tüp barkotunun görünür olmasına dikkat edilerek tray'e yerleştirilir.
- BD MAX sistemi açılır kullanıcı adı ve şifre girilerek uygun oturum açılır.

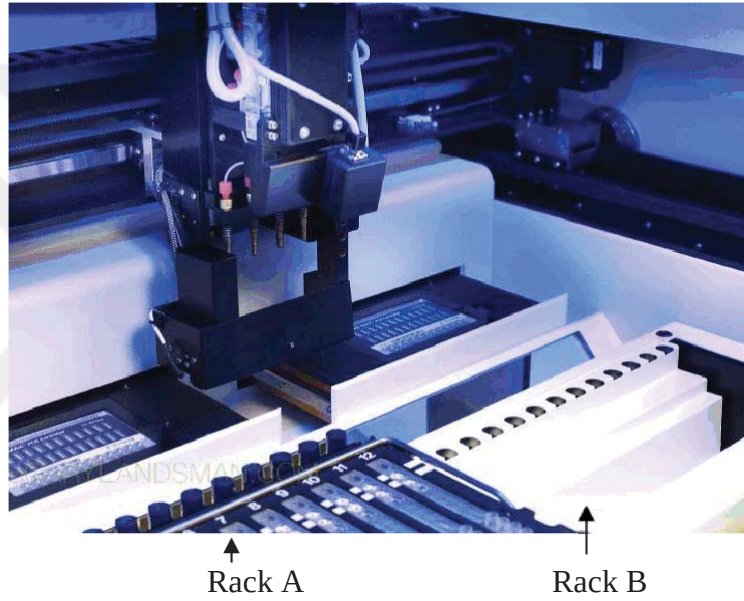
- Gerekli sayıda BD MAX DNA Reaktif Stripi, BD MAX CRE Test Kitinden çıkarılır. Tüm sıvıların tüplerin tabanında olduğundan emin olmak için her strip hafifçe sert bir yüzeye vurulur.
- Gerekli sayıda ekstraksiyon tüpü, MMK (SPC) tüpü ve CRE primer prob tüpü koruyucu torbalarından çıkarılır. Kullanılmayacak tüpler için torbadaki fazla hava alınır ve torba düzgün şekilde kapatılarak saklanır.
- Test edilecek her numune için, rack A'nın 1. pozisyonundan başlayarak sırayla devam ederek reaktif şeritleri BD MAX sistem Rafına yerleştirilir.
- Extraction tüpü (beyaz folyo) her BD MAX DNA reaktif şeridinin 1. Pozisyonuna takılır.
- Reaktif şeridinin 2. Pozisyonuna bir adet MMK (SPC) tüpü (yeşil folyo) yerleştirilir.
- BD MAX CRE primer ve prob tüpü (gri folyo) reaktif şeridinin 3. Pozisyonuna takılır. Tray cihaz içine yerleştirilir.



Şekil 3.1. BD MAX DNA reaktif şeridi

- BD MAX yazılımında çalıştır ekranının altındaki sarf malzemeleri sekmesi seçilir. Tarayıcıyla taranarak veya manuel girişle BD MAX CRE Testi için kit lot numarası girilir.
- İş listesi sekmesi seçilir, analiz alanı tıklanır ve açılır menü kullanılarak BD MAX CRE RUO program seçilir. Bu, rack A için kalan test alanlarını "BD MAX CRE" ile otomatik olarak dolduracaktır. Kullanılmayan satırlardaki "BD MAX CRE" analizinin seçimi kaldırılır. İlk sıradan itibaren sample

buffer t p barkodu tarayıcıyla taranarak veya manüel giri le, Rack A'nın 1. Pozisyonundan ba lanarak sample buffer t p kimliği ve numune kimliği girilir. Lot No alanı tıklanarak açılır menüyü kullanarak uygun kit lot numarası seçilir (dış kutunun üzerinden). Bu, Rack A için kalan parti numarası alanlarını aynı parti numarasını otomatik olarak dolduracaktır. Rack A 2.pozisyon için bilgi girilir ve racktaki kalan tüm sample buffer tüpleri için aynı işleme devam edilir. (Her yeni kit lot numarası için bu adım tekrarlanmalıdır). Rack B için bu adım tekrarlanmalıdır.



Şekil 3.2. BD MAX Rack A ve Rack B

- BD MAX Sample buffer tüpleri, çalışma listesine girilen ile aynı sırayı izleyerek racklara yerle tirilmeli. Tüpler arasında atlayıp boş pozisyon bırakılmamalıdır. Tüplerin, barkod etiketleri dışarı bakacak şekilde numune rafına yerleştirilmelidir bu, (numune girişinde tüpleri taramayı kolaylaştırır).
- Gerekli sayıda BD MAX PCR Kartu unu BD MAX Sistemine yerleştirilir.
- Her bir kartu  (12 numunelik), 2 farklı çalışma için kullanılabilir. BD MAX Sistemi, her çalışma için PCR kartu undaki konumu ve satırı otomatik olarak seçecektir.



Şekil 3.3. BD MAX PCR kartuşu

- İşlemi başlatmak için BD MAX Sistem kapağı kapatılır ve başlat düğmesine tıklanır. Çalışmanın sonunda sonuçlar kontrol edilir veya 2-8°C'de Sample buffer tüpleri sonuçlar kontrol edilene kadar saklanabilir.
- Indeterminate (IND), unresolved (UNR) veya incomplete (INC) sonuç elde edildiğinde veya eksternal kontrol hatası oluştuğunda, sample buffer tüpünden bir tekrar test yapılmalıdır.

Sonuçların yorumlanması:

Sonuç	Yorum
KPC +, OXA-48 + veya NDM +	bla KPC geni, bla OXA-48 geni veya bla NDM geni tespit edildi
NEG	bla KPC geni, bla OXA-48 geni veya bla NDM geni saptanmadı
UNR	Unresolved - inhibitör numune veya reaktif arızası
IND	Indeterminate (BD MAX Sistem hatası)
INC	Incomplete Run

Her BD MAX ekstraksiyon tüpü, sentetik bir hedef DNA dizisi içeren bir plazmid olan sample processing control (SPC) içerir. Bu örnek işleme kontrolü, numunede bulunan herhangi bir DNA ile birlikte ekstrakte edilecek, elue edilecek ve amplifiye edilecektir. SPC, örnek işleme aşamaları sırasında DNA yakalama, yıkama ve elüsyon verimliliğini, ayrıca PCR analizi sırasında DNA amplifikasyon ve tespit verimliliğinin izlenmesini sağlayacaktır. SPC sonucu kabul kriterlerini karşılamayı başaramazsa, numunenin sonucu unresolved (UNR) olarak rapor edilecektir. Çözülmemiş bir sonuç, numuneyle ilişkili inhibisyon veya reaktif hatasının göstergesidir. Çözülmemiş olarak bildirilen herhangi bir örnekte test tekrarlanmalıdır.

BD MAX'in diğer bir avantajı kullanıcının sadece firmanın kitlerine bağlı değil kendi in-house primer prob setlerini de cihazda uygulayabilmesi ve standardize bir şekilde çalışabilmesidir. Rutin birçok klinik materyalden (plazma, serum, idrar, kuru swab, BOS, transport besiyeri içeren swablar, dışkı, balgam, vb.) ekstraksiyon yapılabilmektedir. Rutinde kullanılan birçok prob teknolojisine de (Taqman, Moleküler boncuk, akrep, vb.) uyumludur. Cihazda, ekstraksiyon ve gerçek zamanlı PCR çalışılabildiği gibi sadece ekstraksiyon ya da sadece PCR tek başına yapılabilmektedir. Bu da kullanıcıya konvansiyonel bir gerçek zamanlı PCR cihazının ve ekstraksiyon cihazının sağladığı esnekliği sağlar. Cihazda herhangi bir zamanda yüklenen testin ekstraksiyon aşaması bitip PCR aşamasına geçildiğinde, bu aşamada yeni testler yüklenebilmektedir. Tam otomatik olması sebebi ile deneyimli teknisyen ihtiyacı bulunmamaktadır. Cihaza tek run için en fazla 24 örnek yüklenebilmektedir. Daha az, hatta tek örnek yüklenmesi test kaybına neden olmamaktadır.

IN-HOUSE PCR:

Enterobacteriaceae izolatları blaKPC, blaNDM, blaOXA-48, blaVIM, blaIMP karbapenemaz genleri ve diğer β -laktamazlardan blaCTX-M genlerin varlığı açısından daha önce tanımlanan PCR yöntemi ile test edilmiştir.

Bakteri süspansiyonu için 1/10 oranında distile su ile sulandırılmış 10X Taqbuffer (Thermoscientific) kullanılmıştır. Her izolat için 1.5 ml'lik ependorfların içine 250 μ l dilüe buffer ve 1mikrolitrelik steril öze dolusu (3-4

koloni) koloni alınarak 1 McFarland kadar bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır.

İzolat başına düşen reaksiyon karışımı, 10µl 2X PCR master miks (Thermoscientific), 1 µl (10 pmol/ µl) hedef öncül primer, 1 µl (10 pmol/ µl) hedef revers primer, 1 µl bakteri süspansiyonu ve 7µl PCR grade su içerecek şekilde toplam 20 µl olarak belirlenmiştir. 95°C’de 3 dakikalık süre sonrasında 95°C’de 15 saniye, 52°C’de 30 saniye ve 72°C’de 1’er dakikadan oluşan 5 döngülük 1. siklus, 95°C’de 15 saniye, 50°C’de 1 dakika ve 72°C’de 1’er dakikadan oluşan 20 döngülük 2. siklus Rotor-Gene (Corbett-Research, Avustralya) cihazında yapıldı.

Tablo 3.1. GZ-PCR protokolünde kullanılan primer ve prob dizileri:

	Primer-Prob	Dizi (5'-3')	pozisyon	ürün
blaKPC	KPC-Fw	GCTGTCTTGTCTCTCATGGCC	394-414	836
	KPC-Rev	AATCCCTCGAGCGCGAGTCTA	1230-1210	
blaNDM	NDM-Fw	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	212-231	475
	NDM-Rev	GTAGTGCTCAGTGTGCGCAT	687-668	
blaOXA-48	OXA-48-Fw	GCGTGTATTAGCCTTATCGGC	5518-5537	722
	OXA-48-Rev	RGGCATATCCATATTCATCGC	6240-6220	
blaVIM	VIM-Fw	TTCTCGCGGAGATTGARAAGC	219-239	264
	VIM-Rev	TTGTCGGYYGAATGCGCAGC	483-464	
blaIMP	IMP-Fw	GGAATAGAGTGCGTTAAYTCTC	372-393	188
	IMP-Rev	ARCCAAACYACTASGTTATC	560-543	
blaCTX-M	CTXM-Fw	ATCTGACGCTGGGTAAAGC	695-713	162
	CTXM-Rev	ATATCGTTGGTGGTGCCATA	857-838	

VIM, Verona integron-encoded metallo- β -lactamase; IMP, Imipenemase; OXA-48, Oxacillinase-48; NDM, New Delhi metallo- β -lactamase; KPC, Klebsiella pneumoniae carbapenemase; CTX-M, Cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase.

3.5. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışma verileri “SPSS for Windows, Version 22.0” paket programı kullanılarak analiz edildi. Veriler, ortalama değer $\pm$ standart sapma ($\pm$ SD), sayı ve yüzde değerler ile belirtildi. Gruplar arasında frekansların karşılaştırılması ve iki taraflı p değerinin hesaplanması için Pearson Ki-kare testi, Fisher's Exact testi, McNemar testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmede elde edilen p değerinin 0.05’den küçük olması anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

2010 – 2015 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Hastanesi’nde yataklı servislerde çeşitli nedenlerle takip altında iken kan kültürlerinde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üremesi olan hastalardan toplam 152 izolat çalışmaya dahil edilmiştir. Hasta grubu 97 erkek, 55 kadından oluşmaktadır ve grubun yaş ortalaması 46.96 ± 23.83 ’dir. Hastalara ait demografik özellikler Tablo 4.1’de görülmektedir.

Tablo 4.1. Demografik özellikler.

DEMOGRAFİK ÖZELLİKLER	BULGULAR (sayı/yüzde)
Hasta Sayısı	154
Cinsiyet (E/K)	97/55((%63.8/36.2)
Ortalama yaş (yıl)	46.96
Yıllara göre dağılım • 2010 • 2011 • 2012 • 2013 • 2014 • 2015	10(%6.6) 13(%8.6) 12(%7.9) 32(%21.1) 37(%24.3) 48(%31.6)
Sağ kalım • Exitus • Yaşıyor	93(%61.2) 59(%38.8)
Yoğun Bakım Yatışı • Var • Yok	95(%62.5) 57(%37.5)

4.1. Bakteri türleri ve PCR Bulguları

Hastaların kan kültürü üremelerindeki karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatları arasında en sık rastalanan tür *K. pneumoniae* ve ikinci olarak da *E. coli* yer almaktadır. En sık görülen karbapenem direnç geni OXA-48'dir ve en sık *K. pneumoniae* izolatlarında görülmektedir. Hastaların kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direnç genleri ile diğer beta-laktamazlardan CTX-M direnç geni varlığının türlere göre dağılımı Tablo 4.2 'de görülmektedir.

Tablo 4.2. 2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen *Klebsiella* spp. türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı

YIL	<i>Klebsiella</i>	Toplam	ÇSS*	KPC	NDM	IMP	VIM	OXA-48 +VIM	OXA-48	OXA-48 +CTX-M	CTX-M
2010	<i>Pneumoniae</i>	16	8	0	0	0	0	0	1	5	2
2010	Diğer türler	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	<i>Pneumoniae</i>	13	9	0	0	0	0	0	6	3	0
2011	Diğer türler	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2012	<i>Pneumoniae</i>	13	9	0	0	0	0	0	1	7	1
2012	Diğer türler	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2013	<i>Pneumoniae</i>	30	30	0	0	0	0	0	9	20	1
2013	Diğer türler	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2014	<i>Pneumoniae</i>	25	25	0	0	1	0	0	8	13	2
2014	Diğer türler	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2015	<i>Pneumoniae</i>	26	26	0	2	0	0	0	8	8	3
2015	Diğer türler	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Toplam		134	108	0	2	1	1	0	33	56	9

ÇSS*: Çalışılan suş sayısı

Tablo 4.3. 2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen *E. coli* türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı

YIL	<i>Escherichia</i>	Toplam	ÇSS*	KPC	NDM	IMP	VIM	OXA-48 +VIM	OXA-48	OXA-48 +CTX-M	CTX-M
2010	<i>Coli</i>	7	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	<i>Coli</i>	11	2	0	0	0	0	0	1	0	1
2012	<i>Coli</i>	10	2	0	0	0	0	0	0	2	0
2013	<i>Coli</i>	19	1	0	0	0	0	0	1	0	0
2014	<i>Coli</i>	24	9	0	1	0	0	0	1	3	4
2015	<i>Coli</i>	17	13	0	0	0	1	0	3	2	7
Toplam		88	28	0	1	0	1	0	6	7	12

ÇSS*: Çalışılan suş sayısı

Tablo 4.4. 2010-2015 arası kan kültürlerinde üreyen *Enterobacter spp.* türlerinde, karbapenemaz geni saptanan üreticisi sayısı

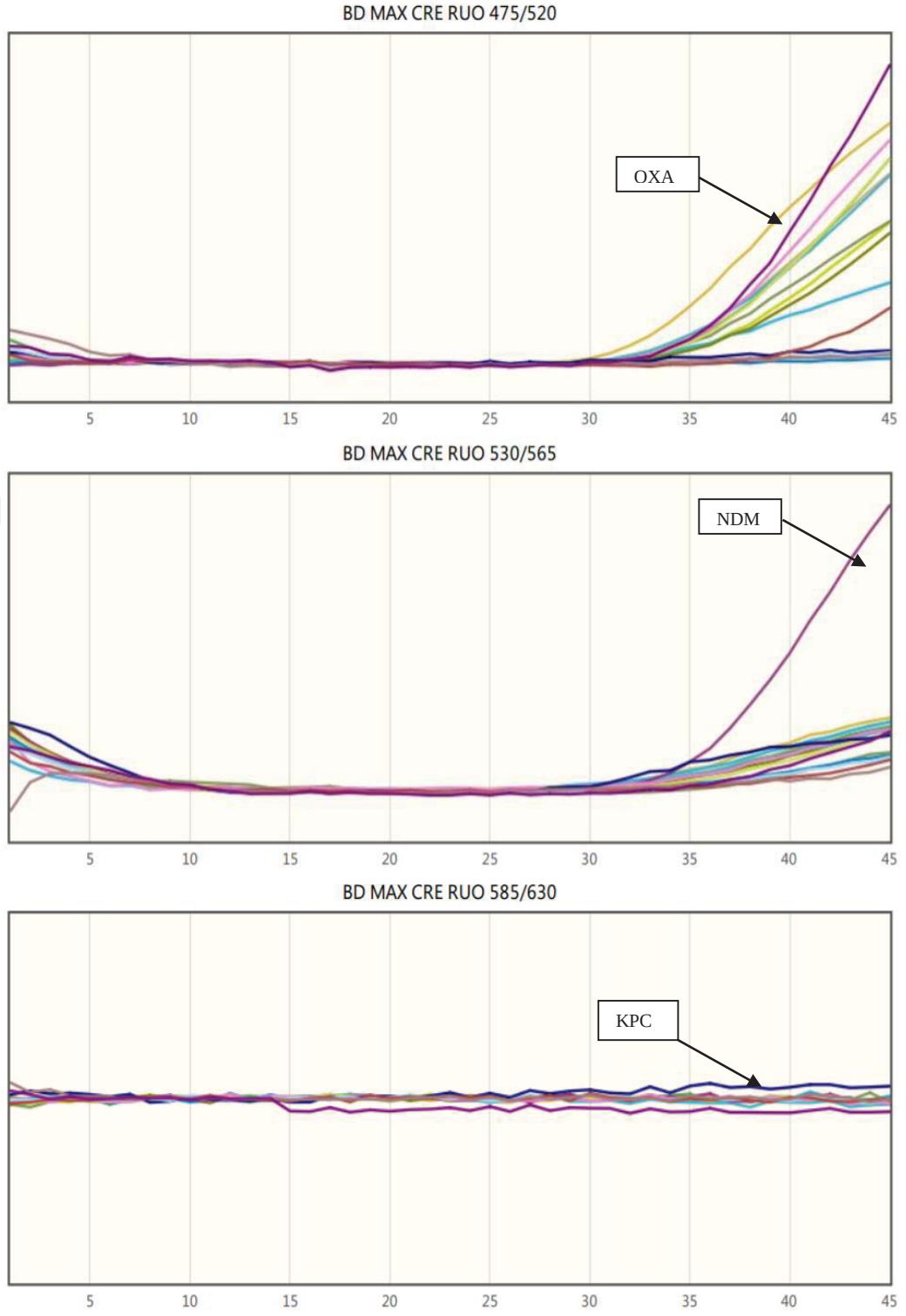
YIL	<i>Enterobacter</i>	Toplam	ÇSS*	KPC	NDM	IMP	VIM	OXA-48 +VIM	OXA-48	OXA-48 +CTX-M	CTX-M
2010	<i>Cloacae</i>	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2010	<i>Aerogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	<i>Cloacae</i>	10	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2011	<i>Aerogenes</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2012	<i>Cloacae</i>	3	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2012	<i>Aerogenes</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2013	<i>Cloacae</i>	8	1	0	0	0	0	0	0	0	0
2013	<i>Aerogenes</i>	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2014	<i>Cloacae</i>	4	1	0	0	0	0	0	1	0	0
2014	<i>Aerogenes</i>	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0
2015	<i>Cloacae</i>	4	4	0	0	0	0	1	0	1	0
2015	<i>Aerogenes</i>	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Toplam		57	13	0	0	0	0	1	1	1	0

ÇSS*: Çalışılan suş sayısı

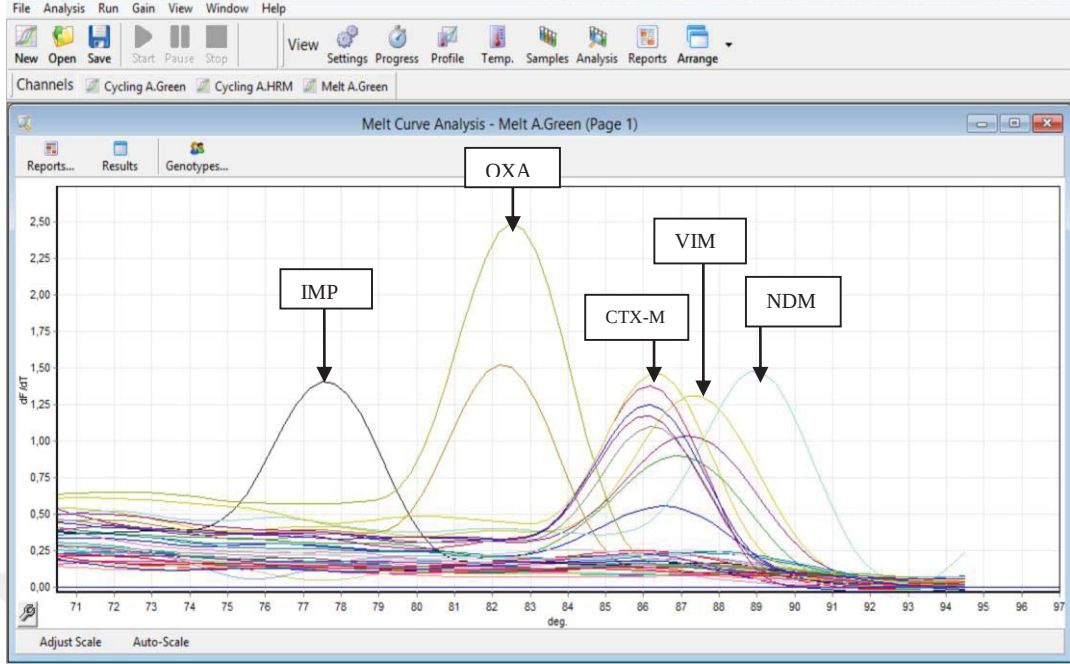
Tablo 4.5. *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direnç genleri ile CTX-M direnç geni varlığının türlere göre dağılımı.

	Sayı/Yüzde	KPC	NDM	IMP	VIM	OXA-48 +VIM	OXA-48	OXA-48 +CTX-M	Karbapenemaz geni negatif	CTX-M
<i>K.pneumoniae</i>	107(%70.4)	0	2	1	0	0	33	56	15	9
<i>E.coli</i>	28(%18.4)	0	1	0	1	0	6	7	13	12
<i>E.cloacae</i>	10(%6.6)	0	0	0	0	1	1	1	7	0
<i>E.aerogenes</i>	3(%2)	0	0	0	0	0	0	0	3	0
<i>K.oxytoca</i>	1(%0.7)	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>M.morganii</i>	1(%0.7)	0	0	0	0	0	0	1	0	0
<i>C.braakii</i>	1(%0.7)	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>S.marcescens</i>	1(%0.7)	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Toplam	152	0	3	1	3	1	40	65	39	21

K. pneumoniae izolatlarının 89 tanesinde (% 83.2) OXA-48, iki tanesinde (%1.9) NDM ve bir tanesinde (%0.9) IMP pozitifliği saptanırken 15 tanesinde (% 14) karbapenemaz geni negatif bulunmuştur. *E. coli* izolatlarında saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde bu türde en sık olarak OXA-48 varlığı (%46.4) görülmekte, birer suşta (%3.6) NDM ve VIM pozitifliği bulunmuştur. Enterobacter türlerinde (*E. cloacae* ve *E. aerogenes* birlikte) saptanan karbapenemaz genleri değerlendirildiğinde bu türde 2 izolatta OXA-48 varlığı, 1 izolatta OXA-48 ve VIM birlikteliği görülmektedir. BD MAX CRE ve In-House PCR bulguları şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de verilmiştir.



Şekil 4.1. BD MAX CRE PCR görüntüsü.



Şekil 4.2. In-house GZ-PCR görüntüsü.

Diğer β -laktamazlardan CTX-M direnç geni varlığı açısından suşlar incelendiğinde 86 (%56.6) suшта CTX-M direnç geni pozitifliği görülürken, 66 (%43.4) suшта CTX-M varlığı saptanmamıştır. OXA-48 ve CTX-M pozitifliğinin birlikte görüldüğü 65 (%61.3) suş bulunmuştur. 107 *K. pneumoniae* suşunun 64 tanesinde (%59.8), 28 *E. coli* suşunun 19 tanesinde (%67.9) CTX-M pozitifliği saptanmıştır.

4.2. Karbapenemaz üreten suşların yıllara göre prevalansı

2010-2015 arasında yatan hastalardan elde edilen kan kültürlerinden 330 *Enterobacteriaceae* spp. izolatu üredi. 152 (%46.1) suшта en az bir karbapenemaz azalmış duyarlılık ve/veya direnç tespit edildi. 113 suшта (üç NDM, bir IMP, üç VIM, bir OXA-48+VIM, 105 OXA-48) karbapenemaz varlığı tespit edildi, prevalansı %34.2 di. Veriler Tablo 4.6 da sunulmuştur. Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede; kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında yıllara göre karbapenemaz üretici sayısının prevalanslarının artışı anlamlı ($p<0,05$) olarak bulunmuştur.

Tablo 4.6. *Enterobacteriaceae* üyelerinde yıllara göre karbapenemaz geni saptanan suş sayısı ile prevalansı

	Suş sayısı	KPC	NDM	IMP	VIM	OXA-48 + VIM	OXA-48	OXA-48 + CTX-M	Prevalans
2010	38	0	0	0	0	0	1	5	%15.8
2011	51	0	0	0	0	0	7	3	%19.6
2012	36	0	0	0	0	0	1	9	%27.8
2013	71	0	0	0	0	0	10	20	%42.3
2014	67	0	1	1	0	0	10	16	%41.8
2015	67	0	2	0	3	1	11	12	%44.8
Toplam	330	0	3	1	3	1	40	65	%34.2

4.3. Suşların Antibiyotik Duyarlılık Durumları ve Direnç Genlerine Göre Değerlendirilmesi

Karbapenemlerin MİK değerleri; ertapenem için ≤ 0.25 - >8 $\mu\text{g/L}$, meropenem için ≤ 0.125 - >8 $\mu\text{g/L}$ ve imipenem için ≤ 0.25 - >8 $\mu\text{g/L}$ aralığında bulunmuştur. OXA-48 direnç geni pozitif izolatların antibiyotik duyarlılıkları tablo 4.11’ de verilmiştir.

Tablo 4.7. Suşlardaki İmipenem duyarlılık sonuçları

		Karbapenemaz direnç geni saptanma sonuçları	
		POZİTİF	NEGATİF
İmipenem duyarlılık sonuçları	R veya I	96	20
	S	17	19

Tablo 4.8. Suşlardaki Ertapenem duyarlılık sonuçları

		Karbapenemaz direnç geni saptanma sonuçları	
		POZİTİF	NEGATİF
Ertapenem duyarlılık sonuçları	R veya I	111	37
	S	2	2

Tablo 4.9. Suşlardaki Meropenem duyarlılık sonuçları

		Karbapenemaz direnç geni saptanma sonuçları	
		POZİTİF	NEGATİF
Meropenem duyarlılık sonuçları	R veya I	82	22
	S	31	17

Tablo 4.10. Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnç oranları

	İmipenem				Meropenem				Ertapenem			
	R	I	S	Direnç Oranı	R	I	S	Direnç Oranı	R	I	S	Direnç Oranı
<i>Klebsiella spp</i> (n:108)	77	17	14	% 71,3	79	6	23	% 73,1	107	-	1	%99,1
<i>E.coli</i> (n:28)	10	3	15	% 35,7	13	1	14	% 46,4	24	3	1	%85,7
<i>Enterobacter spp</i> (n:13)	3	3	7	% 23,1	3	1	9	% 23,1	12	-	1	%92,3
Diğerleri (n:3)	2	1	-	% 66,7	1	-	2	%33,3	1	1	1	%33,3

Tablo 4.11. OXA-48 direnç geni pozitif izolatların antibiyotik duyarlılıkları.

No	üreme	PCR	CIP	LEV	TZP	CZ	CXM	FOX	CRO	CTX	CAZ	CPS	FEP	IMP	MER	ETP	TGC	CL
10 320	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	R	N	N
10793	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	R	I	I	R	N	N
10 970	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	R	I	R	R	N	N
10 2015	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	N	R	N	R	R	S	S	R	N	N
10 2276	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	I	N	I	N	R	S	R	S	R	N	N
10 2388	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 139	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	R	N	N
11 1016	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 1054	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 1481	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 1502	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 1529	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	I	R	N	R	N	R	N	S	S	S	S	R	N	N
11 2055	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
11 2081	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	N	R	N	R	S	I	S	R	N	N
11 3255	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	R	N	R	S	R	R	R	N	N
12 176	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	S	N	R	N	R	R	I	S	R	N	N
12 2921	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
12 2953	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
12 3040	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	I	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
12 3494	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
12 3588	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	S
12 3754	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	I	N	N	R	S	R	R	R	N	N
12 4064	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 70	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 149	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 238	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 771	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 793	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 935	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	I	R	N	N
13 1140	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 1251	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 1333	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 1334	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	S	S	R	N	N
13 1451	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 1628	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	R	N	R	R	S	R	R	N	N
13 1629	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 1700	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	S	R	N	N	R	R	I	S	R	N	S
13 1931	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 2322	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	I	S	R	R	N	R	S	N	N	I	S	R	R	R	N	N
13 2690	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	I	R	N	N
13 2746	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	S	R	N	N	R	R	R	S	R	N	N
13 2750	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	S	S
13 2988	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	S	S	R	N	N
13 4056	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 5051	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 5460	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	R	R	S	R	R	R	I	S
13 5461	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 5462	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 5733	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
13 5921	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 5924	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
13 6014	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	I	N	N	I	S	R	R	R	N	N
14 203	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	I	S	R	N	N
14 830	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	I	R	N	N	R	R	R	I	R	N	N
14 1139	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	S	R	S	R	R	R	N	N
14 1201	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	I	R	N	R	S	N	N	I	S	I	R	R	N	N
14 1470	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	I	N	N	R	S	R	R	R	N	N
14 1626	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	N	I	S	R	R	R	N	N
14 1925	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	I	I	R	S	R	N	N
14 2310	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
14 2794	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	S	N	S	R	S	R	R	R	N	N
14 3084	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	I	S	R	R	N	S	R	N	N	I	S	S	S	R	N	N
14 3133	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	S
14 3431	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	S	N	N	S	S	S	S	R	N	N

14 3669	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	R	S	S	S	R	N	N
14 3863	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	S	R	N	N	I	I	I	S	R	N	N
14 3862	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	I	S	R	R	N	S	R	N	N	I	S	S	S	R	N	N
14 4021	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	S	N	N	S	S	I	S	R	N	N
14 4148	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
14 4331	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
14 4411	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	I	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	R	S	R	N	N
14 4452	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
14 4563	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	S	N	N	S	S	I	S	R	S	N
15 395	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	N	N	N	R	R	R	R	R	S	N
15 2021	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	S	R	R	R	S	N
15 2236	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	I	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	R	R	R	S	N
15 2517	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	R	R	R	N	R	R	N	N	R	S	R	R	R	S	N
15 3605	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	I	R	R	I	S
15 3677	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	I	S
15 3828	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	S	S
15 4319	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	I	S
15 4753	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	S	R	R	R	I	S
15 4784	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	S	N	R	N	R	N	I	N	I	N	R	R	R	R	R	S
15 4789	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	I	R	R	R	I	S
15 4827	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	I	R	R	I	S
15 4941	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	I	I	R	R	I	R
15 5191	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	I	R	R	R	R	S
15 5541	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	I	I	R	R	S	R
15 6009	<i>K.pneumoniae</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	R	R	R	I	S
11 1869	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	I	R	N	R	N	R	N	S	S	S	S	R	N	N
12 2756	<i>E.coli</i>	OXA	R	I	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	S	S
12 3007	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	R	R	N	I	R	N	N	R	R	S	I	R	N	N
13 5653	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	S	N	N	R	S	R	R	R	N	N
14 153	<i>E.coli</i>	OXA	R	I	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	R	R	S	S
14 1946	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	R	R	R	N	N
14 4330	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	R	R	N	I	R	N	N	R	R	S	S	R	N	N
14 4346	<i>E.coli</i>	OXA	R	R	S	R	N	S	R	N	N	S	S	I	R	R	N	N
15 1994	<i>E.coli</i>	OXA	S	S	R	R	N	S	R	N	N	R	R	S	S	I	S	N
15 3767	<i>E.coli</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	S	S	R	S	S
15 3918	<i>E.coli</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	R	N	R	S	S	R	S	S
15 5376	<i>E.coli</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	S	N	S	N	R	R	R	R	S	S
15 5650	<i>E.coli</i>	OXA	R	N	R	N	R	N	R	N	I	N	R	R	R	R	S	S
15 5456	<i>E.cloacae</i>	OXA*	R	N	R	N	N	N	R	N	R	N	R	I	I	R	S	S
14 3492	<i>E.cloacae</i>	OXA	R	N	I	N	N	R	R	N	N	N	S	S	S	R	N	N
15 1949	<i>E.cloacae</i>	OXA	I	S	I	R	N	R	R	N	N	I	R	I	S	R	S	N
15 1824	<i>M.morganii</i>	OXA	S	S	R	R	N	R	R	N	N	R	R	R	S	I	R	N

*: OXA-48 ve VIM birlikteliği

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, N: Çalışılmamış, CİP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, CZ: Sefazolin, CXM: Sefuroksim, FOX: Sefoksitin, CRO: Seftriakson, CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, CPS: Sefaperazon/Sulbaktam, FEP: Sefepim, İMP: İmipenem, MER: Meropenem, ETP: Ertapenem, TGC: Tigesiklin, CL: Kolistin.

Tablo 4.12. BD MAX sistemi ile karbapenem direnç geni saptanan izolatların antibiyotik duyarlılık durumları (n%).

Antibiyotikler	OXA-48 n(%)			
	S	I	R	N
AN	99(93.4)	4(3.8)	3(2.8)	0
GN	53(50)	0	53(50)	0
ETP	0	2(1.9)	104(98.1)	0
İMP	16(15.1)	17(16)	73(68.9)	0
MER	27(25.5)	6(5.7)	73(68.9)	0
FOX	19(17.9)	5(4.7)	65(61.3)	17(16)
CRO	17(16)	4(3.8)	67(63.2)	18(17)
FEP	40(37.7)	6(5.7)	60(56.6)	0
TZP	1(0.9)	5(4.7)	100(94.3)	0
CIP	26(24.5)	6(5.7)	74(69.8)	0
LEV	31(29.2)	2(1.9)	55(51.9)	18(17)
TMP/SXT	38(35.8)	0	65(61.3)	3(2.8)
TGC	17(16)	9(8.5)	3(2.8)	77(72.6)
CL	22(20.8)	0	2(1.9)	82(77.4)

n: İzolat Sayısı, S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, N: Çalışılmamış, AN: Amikasin, GN: Gentamisin, ETP: Ertapenem, İMP: İmipenem, MER: Meropenem, FOX: Sefoksitin, CRO: Seftriakson, FEP: Sefepim, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, CİP: Siprofloksasin, LEV: Levofloksasin, TMP/SXT: Trimetoprim/Sulfametaksazol, TGC: Tigesiklin, CL: Kolistin.

4.4. Klinik Özellikler ve Direnç Genlerinin Karşılaştırılması

Ex olan 93 hastanın 70'inde OXA-48 direnç geni pozitifliği bulunmuştur. OXA-48 varlığı ve exitus arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.047$).

Yoğun bakım yatışı olan 95 hastanın 68'inde, yatışı sırasında kateter kullanımı olan 121 hastanın 87'sinde, cerrahi tedavi alan 59 hastanın 44'ünde ve immunsupresif tedavi alan 109 hastanın 74'ünde OXA-48 varlığı gözlenmiştir. OXA-48 varlığı ve yoğun bakım yatışı, kateter kullanımı, cerrahi tedavi ve immunsupresif tedavi alımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

Hastaların izolatlarında kültür sonucu karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üretilmesinden önce mevcut aldıkları antibiyotik tedavileri incelendiğinde kültür öncesi kolistin tedavisi alan 28 hastanın 25'inde OXA-48 direnç geni varlığı gözlenmiş, OXA-48 varlığı ve kolistin kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.008$). Kültür öncesi karbapenem tedavisi alan 106 hastanın 75'inde ve yine kültür öncesi tigesiklin tedavisi alan 17 hastanın 14'ünde OXA-48 direnç geni varlığı gözlenmiş, OXA-48 varlığı ve karbapenem grubu ya da tigesiklin kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$).

5. TARTIŞMA

Nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde gram negatif bakteriyemiler %20-50 mortalite oranına sahiplerdir (115). Genelde bu enfeksiyonlarda ilk tercih olarak kullanılan β -laktam grubu antibiyotiklere dirence neden olan β -laktamazlar yıllar geçtikçe tek antibiyotiğe direnç gösteren enzimler olmaktan çıkıp mutasyon ve modifikasyonlarla direnç spektrumlarını geliştirmişler ve GSBL ları oluşturmuşlardır. İnsanoğlunun bakterilere karşı devam eden savaşında yeni β -laktam antibiyotikler geliştirilmeye devam edilmiş olup son silah olarak görülen karbapenem grubu antibiyotikler ile savaşta bakterilerin önüne geçildiği sanılmıştır. Ancak bakteriler karbapenemaz olarak isimlendirilen yeni β -laktamaz enzimleriyle savaşta tekrar öne gelmiş durumdadırlar.

Enterik bakterilerde GSBL varlığı ve karbapenemaz genleri mobil genetik materyaller vasıtasıyla hızla yayılarak artmaktadır. Bu durum enfeksiyon kontrolü açısından sorun yaratmaktadır (116). Özellikle karbapenemaz aktivitesine sahip enterik bakteriyel enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlandığından, hastaların hastanede yatış süresinin uzamakta, morbidite ve mortalitede artışa neden olmaktadır (117).

Çalışmamızda AÜTF hastanesinde 2010-2015 arasında yatan hastalardan alınan kan kültürlerinden izole edilen karbapenemaz dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarındaki GSBL ve karbapenemaz enzim varlığı, tipi, sıklığı, epidemiyolojisi, prevalansını ve yerel verilerimizin araştırılmasını amaçladık.

MHT ile karbapenemaz enziminin tipinin belirlenememesi, CTX-M veya AmpC tipi β -laktamaz üreten suşların bazen dış membran permeabilite geçirgenliğinin azalmasından dolayı yanlış pozitiflik vermesi ve MBL üreten suşlarda zayıf karbapenemaz aktivitesinden dolayı testin yorumlanması ve standardizasyonundaki sorunlar olmasından dolayı rutinde MHT kullanımı tercih edilmemektedir (118). 2012 yılında ise CLSI epidemiyolojik ya da enfeksiyon kontrolü dışındaki amaçlarla MHT yapılmasına gerek olmadığını belirtmiştir (107).

Hızlı tanı amacıyla geliştirilen hazır besiyerleri (Chromagar KPC, Supercarba...) 48 saat içerisinde karbapenem direnci tespit edebilmesine rağmen pahalı olması nedeniyle rutinde kullanımını kısıtlıdır (119).

Karbapenem direncine yol açan genlerin PCR ile tespit edilmesi altın standart olarak kabul görmektedir. Artmış yeni varyant sayısı ve gen çeşitliliğinden dolayı, negatif saptanan suşlar referans laboratuvarlarına gönderilerek dizi analizi ile doğrulama yapılması önerilmektedir (2).

CDC, NHSN verilerine göre 2001-2011 arasında karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* oranının %1,2'den %4,2'ye, *K. pneumoniae* oranının %1,6'dan %10,4'e ve *Enterobacter spp.* oranının ise %1,4'ten %3,6'ya çıktığını bildirmiştir (120). European Antimicrobial Resistance Surveillance (EARS) verilerine göre Yunanistan'da imipenem dirençli *K. pneumoniae* oranı 2001'de %1 iken, 2006'da %20'ye yükselmiştir. YBÜ de oran ise 2006'da %50 olarak saptanmıştır (121). 2008-2011 yılları arasında Lübnan Beyrut Tıp Merkezinde GSBL üreten 2243 *E. coli* ve 572 *K. pneumoniae* izolatında karbapenem duyarlılığını belirlemek için çalışmalar yapılmış, *E. coli* suşların %99,7'i imipeneme, %99,5'i meropeneme, %89,9 ertapeneme; *K. pneumoniae* suşların %89,7'i imipeneme, %88,1'i meropeneme ve %87,6 ertapeneme duyarlı olduğunu tespit edilmiştir. Ek olarak üç *E. coli* ve beş *K. pneumoniae* izolatlarının tüm karbapenemlere dirençli olduğunu bildirmişlerdir (122).

Ülkemizde 2000-2003 yılları arasında dokuz merkezin katıldığı MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) çalışmasının sonuçlarına göre *Enterobacteriaceae* üyelerinde; meropeneme %99,3, imipeneme %97,6 duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir (123). 2007 yılında yapılan çok merkezli HITIT-2 çalışmasının sonuçlarına göre *E. coli* izolatlarında karbapenem direnci tespit edilmemiş, *K. pneumoniae* izolatlarında imipenem direnci %3,1 olarak bildirilmiştir (124). EARS-2008 çalışmasında Türkiye'de karbapenem direncinin %1-5 arasında olduğunu bildirmiştir (125). 2001-2009 arasında GSBL pozitif suşlarda Köksal ve ark. tarafından yapılan çalışmada ve 2009 yılında Duman ve ark. tarafından kan kültürlerinden izole edilen 119 *E. coli* ve 39 *Klebsiella spp.* suşlarında yapılan çalışmada karbapenem direnci saptamadıklarını bildirmişlerdir (126,127). Yılmaz ve ark. da ise çalışmalarında ertapeneme karşı *E.coli*'de %3,

K.pneumoniae'de ise %13 direnç saptamışlardır (128). Eser ve ark. tarafından 2005-2009 arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde yapılan çalışmada kan kültüründen izole edilen 210 *Enterobacteriaceae* (153 *E. coli*, 47 *K.pneumoniae*, 10 *K. oxytoca*) suşunda %11'inde karbapenem direnci saptanmış, imipenem, meropenem ve ertapenem direnç oranları sırasıyla %5.7 (n:12), %1.9 (n:4) ve %2.4 (n:5) olarak bildirmişlerdir (129). Aytar ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada kan kültüründen izole ettikleri 199 örnekte *K. pneumoniae* de %6 oranında karbapenem direnci tespit ettiklerini, *E. coli* de ise direnç tespit etmediklerini bildirmişlerdir (130).

Bizim çalışmamızda ise karbapenem direnci olan 152 [107 *K. pneumoniae*, 28 *E. coli*, 13 *Enterobacter spp* ile birer *K. oxytoca*, *M. morganii*, *C. braaki*, *S. marcescens*] kan izolatın tespit edilmiştir. *Klebsiella spp*, izolatlarında sırasıyla imipenem, meropenem ve ertapenem direnç oranları %71,3, %73,1, % 99,1, *E.coli* izolatlarında direnç oranları %35,7, %46,4, % 85,7, *Enterobacter spp.* izolatlarında direnç oranları %23,1, %23,1, % 92,3 olarak bulunmuştur.

EUCAST *Enterobacteriaceae* suşlarında karbapenemaz varlığının taramasında özellikle meropenemi önermektedir. Ayrıca MİK değerleri sırasıyla meropenem (> 0.12 µg/ml), imipenem (> 1 µg/ml) ve ertapenem (> 0.12 µg/ml) olan izolatlar doğrulama testlerinin yapılması da önermektedir (131). Meropenemin sınıf A tipi enzimler için taramada duyarlılığının çok yüksek olduğu saptanmıştır. Ertapenem direnç için izolatta bulunabilen AmpC veya GSBL ile birlikte porin kaybı yeterli olabilmektedir. Bu nedenle ertapenemin, karbapenemaz taramasında özgülüğü düşüktür. *Proteus*, *Serratia*, *Providencia* ve *Morganella* izolatlarında karbapenemaz bulunmaksızın farklı mekanizmalar ile imipenem direnç gelişebilmesinden dolayı imipenem taramada önerilmemektedir (132).

Türkiye'nin de bulunduğu 10 ülkeden yapılan çok merkezli bir çalışmada, 2001-2011 yılları arasında izole edilmiş OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri antibiyotik gradiyent test yöntemi ile retrospektif olarak değerlendirilmiş; izolatların %34.1'i imipenem, %33'ü meropenem ve %90.1'i ertapenem dirençli bulunmuştur (133). Türkiye'de 18 merkezin katılımı ile gerçekleştirilen diğer bir çalışmada

karbapenemlerden en az birine dirençli olan 155 klinik izolatın [21'i *E.coli*, 134'ü *K. pneumoniae*] 143'ünde karbapenemaz enzimi tespit edilmiş, izolatların hepsinin ertapeneme dirençli ve 49'nun imipeneme, 64'nün meropeneme duyarlı olduğunu bildirilmiştir. MBL pozitif saptanan 15 izolatın hepsini tüm karbapenemlere dirençli olarak, sadece OXA-48 pozitif olan 121 izolatın 72'sini imipeneme, 64'nü meropeneme ve tümünü ertapeneme dirençli olarak bildirmişlerdir. OXA-48 pozitif izolatların 12'si meropenem açısından EUCAST tarama kriterinin altında kaldığı, buna karşın ertapenem MİK değerleri tüm izolatlarda tarama değerinin üzerinde olduğunu saptamışlar ve bu sebeple OXA-48'in çok yaygın görüldüğü ülkemizde karbapenemaz tarama kriteri olarak ertapenemin kullanılmasının daha uygun olacağını önermişlerdir (134).

Bizim çalışmamızda 152 [107 *K. pneumoniae*, 28 *E.coli*, 13 *Enterobacter spp* ile birer *K.oxytoca*, *M.morganii*, *C.braaki*, *S.marcescens*] kan izolatından 113 karbapenemaz enzimi tespit edilmiş, 36'sı imipeneme, 48'i meropeneme ve 4' ü ertapeneme duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda ertapenem karbapenemaz varlığını taramada en duyarlı, imipenem ise en özgül karbapenem olarak bulunmuştur. Ertapenem, imipenem ve meropenem duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla (0,9823-0,0513), (0,8496-0,4872) ve (0,7257-0,4359) olarak saptanmıştır.

Yunanistan'da yapılan Falagas ve ark.'nın çalışmalarında, en az 3 antibiyotik grubuna dirençli *Enterobacteriaceae* izolatları 'Multi Drug Resistant' olarak tanımlanmışlar ve bu grupta olan izolatların antibiyotik duyarlılık oranlarını sırasıyla: Fosfomisin (%92.8), tigesiklin (%92.1), kolistin (%73), imipenem (%35.5), tetrasiklin (%20.4), gentamisin (%19.7), trimetoprim/sülfametaksazol (%12.5) ve siprofloksasin (%10.5) olarak bildirmişlerdir (135).

Türkiye'de yapılan çalışmalar incelendiğinde; Gülhane Askeri Tıp Akademisi Hastanesinde Kılıç ve ark., yedi aylık bir dönem sonunda 515 klinik *Enterobacteriaceae* izolatı arasından izole ettikleri dört karbapenem dirençli suşun (üç *K. pneumoniae* ve bir *E. coli*) PCR ve dizi analizlerinde blaOXA-48 saptamış, yapılan antibiyotik duyarlılık testleri sonucu: Amikasin (%100), aztreonam (%50), sefepim (%50), siprofloksasin (%50), levofloksasin (%50),

kolistin (%75), tetrasiklin (%50), tigesiklin (%100) ve trimetoprim/sülfametaksazole (%50) duyarlı olarak bildirmişlerdir (136).

Çalışmamızda karbapeneme dirençli olduğu belirlenen izolatlar arasında çeşitli antibiyotiklere karşı yapılan duyarlılık testi sonuçlarına göre: penisilin, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları, sefalosporinler (sefepim hariç) ve ertapenem karşı %80 üzeri yüksek direnç oranları tespit edildi. Siprofloksasin (%63,8), trimetoprim/sülfametaksazole (%62,5), meropenem (%63,2), imipenem (%60,5), sefepim (%60,5), gentamisin (%44,7) ve özellikle amikasin (%7,2) daha düşük boyutlarda direnç gözlenmiştir.

Ülkemizdeki çalışmalarla bulgularımız kıyaslandığında genel olarak benzer olduğu söylenebilir. Farklılıkların ise aradan geçen yıllarda ülkemizin antibiyotik direnç profilinin değişmesi, hastaneler ve/veya coğrafi farklılıklar olduğu düşünülebilir. Literatür verileri bizim verilerimizle birlikte yorumlandığında ortaya çıkan gerçek antibiyotik direncinin büyük boyutlara ulaştığı ve bu direncin esas yüzünü gösterdiği alan olan kliniklerde hekimlerin kullanabileceği antibiyotik seçeneklerinin giderek daraldığıdır. Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden gentamisin (%44,7) ve amikasin (%7,2) direnç oranlarının ise daha düşük bulunmuş olması, bu ilacın hastanemizdeki tedavi protokollerinde sıklıkla tercih edilmiyor olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür.

Çin’de 2004-2008 yılları arasında yapılan bir çalışmada karbapenem dirençli 49 *Enterobacteriaceae* üyesinin altısında (dört *K. pneumoniae*, iki *E.coli*) (%12,2) blaKPC-2 bildirilmiştir (137). 2008-2009 yılları arasında SMART sörveyans programı çalışmasından elde edilen 142 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin 49’unda (%34,5) blaKPC ve 27’sinde (%19,1) blaNDM-1 bildirilmiştir (138). İtalya’da yapılan bir başka çalışmada bir üniversite hastanesinde iki *K. pneumoniae* izolatında blaKPC bildirmiştir (139). Health Protection Agency’s Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory tarafından yapılan çalışmada ise karbapenem dirençli 55 izolatın sekizinde (yedi *K. pneumoniae*, bir *E. cloaceae*) (%14,5) blaKPC, 10 tanesinde (yedi *K. pneumoniae*, iki *E. cloaceae* ile bir *E. coli*) (%18,1) blaIMP, üçünde (*K. pneumoniae*) (%5,5) blaVIM ve 21 tanesinde (10 *K. pneumoniae*, 11 *E. coli*)

(%38,2) blaOXA-48 bildirilmiştir. İngiltere ulusal verilere göre: 2008 yılında 23, 2009 yılında 73, 2010 yılında 333 ve 2011 yılında ise 561 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatu saptanmıştır. Karbapenemazların prevalansı %62 KPC, %14 NDM, %12 VIM, %9 OXA-48 benzeri ve %2 IMP olarak bildirilmiştir. Fransa ulusal verilere göre: 2009 yılında 6, 2010 yılında 28, 2011 yılının ilk dokuz ayında 62 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatu saptanmış, karbapenemazların prevalansı ise %51 OXA-48, %25 KPC, %9 VIM, %13 NDM, %1 IMI-1 ve %1 IMI-2 bulunmuştur (140). İngiltere’de yapılan diğer bir çalışmada karbapenem direnci saptanan 24 *Klebsiella spp.* izolatinın üçünde (%12,5) blaKPC bildirilmiştir (141). Almanya’da yapılan bir başka çalışmada çeşitli klinik örneklerden elde edilen 132 *Enterobacteriaceae* (65 *K. pneumoniae*, 18 *E. coli*, 35 *Enterobacter spp.* ve 14 diğer *Enterobacteriaceae*) izolatında karbapenemaz genleri araştırılmıştır. 13 suşta KPC-2, 11 suşta KPC-3, bir suşta hem KPC-2 hem de VIM-1, dört suşta NDM-1 tespit edilmiştir. Çalışmada tanımlanan VIM-1, VIM-2, VIM-4, IMP-13 ve IMP-14 gen bölgelerinin oranları sırasıyla %13,6, %1,4, %2,1, %0,7, %1,5 olarak bildirilmiştir (142).

Çalışmamızdaki verilerimize göre; kan kültürlerinde üreyen 2010 yılında 38 *Enterobacteriaceae* izolatından 6 (%15,8), 2011 yılında 51 *Enterobacteriaceae* izolatından 10 (%19,6), 2012 yılında 36 *Enterobacteriaceae* izolatından 10 (%27,8), 2013 yılında 71 *Enterobacteriaceae* izolatından 30 (%42,3), 2014 yılında 67 *Enterobacteriaceae* izolatından 28 (%41,8), 2015 yılında ise 67 *Enterobacteriaceae* izolatından 29 (%44,8) karbapenemaz üreten dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu saptanmıştır. Bu durum hastanemizde gram negatif bakterilerde gözlenen karbapenem direncin 2010-2015 yılları arasında ne kadar dramatik bir değişim gösterdiğini açısından önemlidir.

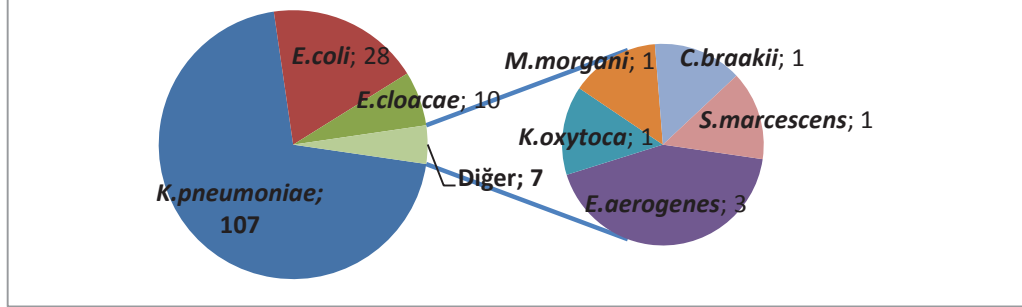
Ülkemizde blaKPC ilk olarak 2012 yılında Kuşku ve ark. tarafından İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde tespit edilmiştir (143). Kayseri’de 137 hastaya ait 94 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda Alp ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada üç suşta blaIMP, bir suşta hem OXA-48 hem de NDM-1, dört suşta ise NDM-1, 86 suşta da OXA-48 tespit ettikleri bildirilmiştir (144). 2011-2014 yılları arasında İstanbul’da 190 *Enterobacteriaceae* (147 *Klebsiella spp.*, 43 *E. coli*) üyesinde Karatuna ve ark.

tarafından yapılan çalışmada karbapenemaz genleri araştırılmış ve 107 suşta (%56,3) blaOXA-48, 24 suşta (%16,7) blaNDM-1, birer suşta (%0,7) blaKPC ve blaVIM tespit edilmiş ancak blaIMP saptanmamıştır (145). 2013-2014 yılları arasındaki dört aylık bir süreçte Afyon Kocatepe Tıp Fakültesinde elde edilen 22 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunun Aşık ve ark. tarafından yapılan çalışmalarında altı suşta blaVIM, dört suşta blaIMP ve tüm suşlarda blaOXA-48 tespit edilmiş ancak blaKPC ve blaNDM'nin hiçbir suşta saptanmadığı bildirilmiştir (146). Demir ve ark. tarafından ise 95 *Enterobacteriaceae* üyesinde yapılan çalışmalarda karbapenemaz geni bulunduran 57 izolatın ikisinde (%3,5) blaVIM, altısında (%10,5) blaNDM-1 ve 49 tanesinde (% 86) OXA-48 pozitifliği bildirmişlerdir (147).

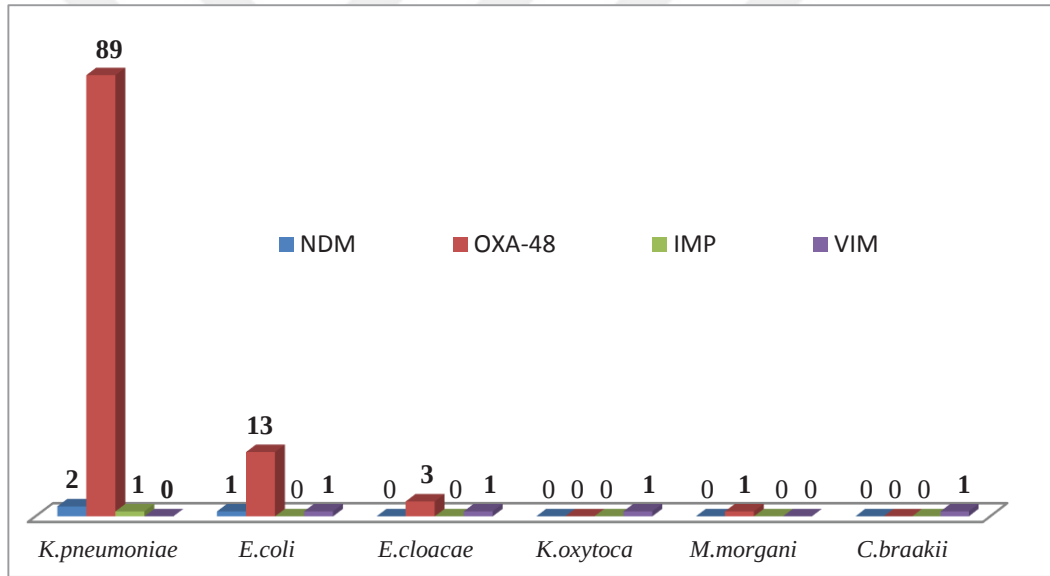
Çalışmamıza dahil edilen izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinin ardından sağlanan direncin genotipik temellerinin irdelenmesi amacıyla karbapenemaz genleri araştırılmıştır. Direnç sağlayan genlerin identifikasyonu amacıyla yapılan BD MAX PCR ve in-house PCR çalışmaları sonucu çeşitli β -laktamaz genleri tespit edilmiştir. Çalışmamız sonuçlarında ise; 152 *Enterobacteriaceae* izolatı (107 *K. pneumoniae*, 28 *E.coli*, 13 *Enterobacter spp.* ve birer *K. oxytoca*, *C. brakii*, *M. morgani* ve *S. marcescens*) içerisinde 113 suşta (%74,3) karbapenemaz geni direnci saptandı. Çalışmamızla ilgili sonuçlar Şekil 5.1. ve Şekil 5.2. de gösterilmiştir. Ek olarak çalışmamızda izolatların hiçbirinde blaKPC saptanmamıştır. Karbapenemlere dirençli olup herhangi bir direnç geni saptanmayan 39 suşta karbapenem direncinden sorumlu mekanizmanın porin kaybı ile birlikte ESBL ya da yüksek düzey AmpC varlığı olabileceği düşünülmüştür.

Çalışmaya dahil edilen karbapenem dirençli 107 *K. pneumoniae* izolatlarının 89'ünde OXA-48 (%83,2), ikisinde NDM-1 (%1,9) ve birinde IMP (0,9) tanımlanmıştır. 28 *E. coli* izolatlarının 13'ünde OXA-48 (%46,4), birer izolatta NDM-1 (%3,6) ve VIM (3,6) genleri tanımlanmıştır. 10 *E. cloacae* izolatlarının üçünde OXA-48 (%30) , bir izolatta ise hem OXA-48 hem de VIM geni saptanmıştır. *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *E. cloacae* izolatlarında en sık görülen β -laktamaz geni OXA-48 olarak saptandı. Birer *K. oxytoca* ve *M. morgani* suşlarında VIM, bir *C. brakii* suşunda ise OXA-48 direnç geni tespit edilmiştir.

Üç *E. aerogenes* ve bir *S. marcescens* izolatlarının hiç birinde karbapenem direnç geni tespit edilmemiştir.



Şekil 5.1. Çalışmamıza alınan izolatların sayısı ve dağılımı



Şekil 5.2. Çalışmamızdaki karbapenemaz üretimi tespit edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde enzim tiplerinin sayısı ve dağılımı

Enterobacteriaceae'lerde MBL'lar diğer karbapenemazlara oranla daha az sıklıkta tespit edilmesine karşın Yunanistan'da *K. pneumoniae*'de VIM-1 plazmid ve integronlar arasında yayılmış, kan izolatlarının % 42'sinde bu enzim ve KPC'ler gösterilmiştir (121). Girlich ve arkadaşları Fransa'da 133 *Enterobacteriaceae* izolatı ile yaptıkları çalışmada MBL ve KPC gen bölgelerini

araştırmış ve MBL saptanan 54 suşun; 19 (%14,2) izolatta VIM, 17 (%12,7) izolatta IMP gen bölgesini saptamışlardır (148). Dortet ve arkadaşlarının yayınladığı epidemiyolojik çalışmada karbapenemaz geni pozitif bulunan 225 *Klebsiella* izolatının beş tanesinde, 33 *Enterobacter* izolatının bir tanesinde, 24 *Citrobacter* izolatının ise 10 tanesinde blaVIM saptanmış ve pozitiflik oranı % 4,7 olarak belirlenmiştir (149). 2008-2010 yılları arasında 13 ülkeyi kapsayan Struelens ve ark. tarafından yapılan çalışmalarında NDM-1 saptanan vaka sayısını; 2008’de 8, 2009’da 30 ve 2010’un ilk 9 ayında 39 olarak bildirmişlerdir (62). Lübnan Beyrut Tıp Merkezinde GSBL üreten 2243 *E. coli* ve 572 *K. pneumoniae* izolatında yapılan bir çalışmada ise, 14 *K. pneumoniae*, 24 *E. coli* suşunda karbapenem direnci saptanmış; karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatların ikisinde NDM-1, birinde ise hem NDM-1 hem de OXA-48 geninin varlığını bildirmişlerdir (122). İngiltere’de yapılan başka bir çalışmada 17 *K. pneumoniae* suşunun dördünde NDM-1 tespit etmişlerdir (141).

Ülkemizde, Gacar ve ark. tarafından 2005 yılında bir *E.cloacae* suşunda VIM-5 bildirilmiştir (150). Aktaş ve ark. tarafından 2006 yılında nöroblastomalı hastanın kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* da IMP-1 bildirilmiştir (92). Altındiş ve ark. ise çalışmalarında karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 44 *Enterobacteriaceae* izolatını Check-Direct CPE testi ile çalışmışlar ancak blaVIM tespit etmemişlerdir (151). Ülkemizde ilk NDM-1 ise 2012 de Poirel ve ark. tarafından hematoloji ünitesinde ki 16 yaşındaki hastadan alınan kan kültüründen izole edilen *K. pnemoniae* da PCR ve seqansla yapılan analizle tespit edilerek bildirilmiştir (93). İkinci NDM-1 pozitif izolat ise Aksu ve ark. tarafından kan kültüründen izole ettikleri *K. pneumoniae* da multipleks PCR yöntemi ile tespit edilerek bildirilmiştir (152). Karadeniz bölgesinde karbapeneme dirençli 210 gram negatif bakterinin Yanık ve ark. tarafından yapılan bir çalışmasında hiçbir suşta NDM-1 geni tespit edilmemiştir (153).

Çalışmamızda *K. pneumoniae*’ye ait bir suşta blaIMP, *E. coli*, *K. oxytoca* ile *C. brakii*’ye ait birer suşta blaVIM, ilave olarak *E. cloacae*’ait bir suşta OXA+VIM birlikteliği saptandı. Toplamda suşlarımızın 5 tanesinde (%3,3) VIM/IMP gen bölgesi saptandı. Bununla birlikte 3 izolatta (iki *K. pneumoniae*, bir *E. coli*) (%2) NDM pozitifliği saptanmıştır. MBL’lara ait VIM ve NDM gen

bölgesi IMP'ye göre *Enterobacteriaceae* üyelerinde daha yüksek oranda saptanmakta olup bizim çalışmamızda da yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olarak bulunmuştur. Ülkemizde yapılan çalışma sonuçları NDM-1 varlığının ülkemizde henüz çok yaygın olmadığını göstermektedir. Ancak NDM-1 plazmid ile kodlanan bir enzim olduğundan ve farklı coğrafyalar arası insan seyahatleri giderek arttığından, bu direncin ülkemizde de bakteriler arasında yayılma riski bulunmaktadır. Hastanemizdeki NDM pozitif suşların sporadik olarak ortaya çıkmış olması hastanemizde enfeksiyon kontrol önlemlerinin yeterli uygulandığı yönünde olumlu bir değerlendirme yapmamızı sağlasa da bu direnç geninin salgın potansiyeli açısından sürekli uyanık olunması gerektiği unutulmamalıdır.

Ülkemizin karbapenemlere dirençli izolatlarla ilk tanışması 2001 yılında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinde izole edilen *K. pneumoniae* 11978 suşu ile olmuştur (154). Bu izolat tüm dünyada rapor edilen karbapeneme dirençli okzasilinaz sentezleyen ikinci *Enterobacteriaceae* suşuydu. Aktaş ve ark 2004-2005 yılları arasında beş aylık dönemde izole edilen 162 *K. pneumoniae* izolatu içerisinde meropenem tedavisi almış, uzun süre hastanede yatış öyküsü olan iki pediatrik hastaya ait suşda OXA-48 pozitifliği saptamışlardır (91). 2007-2011 yılları arasında Başkent Üniversitesi Hastanesinde izole edilen 16 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunun Azap ve ark. tarafından yapılan moleküler epidemiyolojisi çalışmasında suşların hepsinde blaOXA-48 saptanmış ancak blaKPC, blaNDM, blaGES, blaIMP ve blaVIM tespit etmediklerini bildirmişlerdir (155). 2004-2012 yılları arasında kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında Biçmen ve ark. tarafından PCR ile yapılan karbapenem direnci çalışmasında suşların % 93.4'ünde (161'i *K. pneumoniae*, 15'i *Enterobacter spp.*, 5'i *E.coli*, 2'si *S. marcescens* ve 1'i *M. morganii*) OXA-48 varlığı tespit edilmiş ancak diğer karbapenemaz gen bölgelerini (blaIMP, blaVIM, blaKPC ve blaNDM) saptamadıklarını bildirilmişlerdir (156). Kasım 2011-Kasım 2012 arası İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesinde Şemen ve ark. tarafından kan kültürlerinden karbapenem direnci tespit edilen 36 hastaya ait *Enterobacteriaceae* ailesinden 37 izolatta yapılan çalışmada: 26 *Klebsiella spp.* suşunun 19'unda OXA-48, birinde VIM-5, yedi *E. coli* suşunun ikisinde OXA-48 ve dört *Enterobacter spp.* suşunun üçünde OXA-48 saptanmış (157). Aktaş ve ark.

tarafından 2012 yılında yapılan bir çalışmada karbapenem dirençli 18 *K. pneumoniae* ve bir *E. coli* suşunda PCR ile OXA-48, IMP, VIM ve SPM-1 gen varlığı incelenmiş; *E. coli* de blaIMP-1 ve tüm *K. pneumoniae* izolatlarında ise blaOXA-48 (% 100) saptadıklarını bildirmişlerdir (91). Aşık ve ark. tarafından yapılan 2012 yılında bildirilen başka bir çalışmada 118 *K. pneumoniae* suşunda PCR ile OXA-48 gen bölgesi araştırılmış ve suşların 22'sinde (% 18.6) pozitif olarak bulmuşlardır (158). Nazik ve ark. tarafından 2011 yılında 22 enterik bakteride yapılan çalışmada *K. pneumoniae* suşunda OXA-48 gen prevalansının %100, 2012 yılında yaptıkları diğer bir çalışmada ise 10 *K. pneumoniae* izolatının 8'inde (%80) OXA-48 geni bildirmişlerdir (159). Nazik ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada OXA-48 saptanan beş *K. oxytoca* suşunda farklı GSBL genlerinin de pozitif olduğu 2014 yılında bildirilmiştir (160).

European Survey on Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* projesi kapsamında, Türkiye'nin değişik bölgelerindeki merkezlerden izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan çalışmada, 18 merkezden Kasım 2013 tarihinden itibaren ilk altı aylık süre içinde karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli olarak saptanan ilk 10 klinik izolat çalışmaya dahil edilmiş, karbapenemaz varlığı şüpheli 155 klinik izolat [21'i (%13.5) *E.coli*, 134'ü (%86.5) *K. pneumoniae*] çalışılmış, *E. coli* izolatlarının 19'ünde (%90.5) ve *K. pneumoniae* izolatlarının 124'ünde (%92.5) olmak üzere toplam 155 izolatın 143'ünde (%92.3) genotipik olarak en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Bu enzimler 136 izolatta tek başına (OXA-48: %84.6; NDM: %6.3; VIM: %2.8; IMP: %1.4) bulunurken, yedi izolatta iki enzim bir arada (OXA-48 + NDM: %2.1; OXA-48 + VIM: %2.1; VIM + NDM: %0.7) olarak tespit edilmiştir. İzolatların hiç birinde KPC enzimi gözlenmemiştir (134).

Ülkemizden yapılan yayınlarda genelde *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenemaz enziminin *K. pneumoniae*'da yaygın olduğu, en fazla rastlanan enzimin OXA-48 olduğu ve KPC'nin saptanmadığıdır. Tüm bu bilgiler ışığında çalışma sonuçlarımızın OXA-48 ve KPC ile ilgili literatür bilgilerini destekler nitelikte olduğu söylenebilir. Bununla birlikte çalışmamızda saptanan NDM (%2) ve VIM (%2) karbapenemazlar önemli ve anlamlıdır. Son yıllarda karbapenemaz üreten izolatlarla bağlı enfeksiyonlardaki artış oranı, bu artışın özellikle OXA-

48'in toplum kaynaklı yayılımına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Sonuç olarak, Türkiye'de olduğu gibi bizim hastanemizde de karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'lar da en sık OXA-48 enzimi saptanmıştır.

Tedavi seçeneklerini neredeyse sıfıra indiren karbapenemaz enzimlerinin varlıklarının ve tiplerinin yerel ve ülke düzeyinde bilinmesi akılcı antibiyotik kullanımımıza katkıda bulunacağı açıktır. Sonuç olarak erken izolasyon ve diğer enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için, duyarlılık testlerinin sonuçlarının doğru analiz edilmesi ve gerektiğinde hızlı doğrulama testlerinin yapılmasının faydalı olacağını düşünüyoruz. Belirli aralıklarla da hastanede saptanan direnç genlerinin moleküler olarak türlerinin belirlenmesinin epidemiyolojik açıdan da faydası olacağını düşünmekteyiz.

Tablo 5.1. *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz genlerinin dağılımı ile ilgili son 5 yılda yapılan çalışmaların verileri

KAYNAK	YER	YIL	Suş Sayısı	IMP (%)	VIM (%)	NDM (%)	OXA-48 (%)	KPC (%)
Doyle (138)	ABD	2012	142	3,5	13,3	19,1	9,8	34,5
Kaase (142)	Almanya	2012	132	2,2	18,1	5,3	18,1	18,1
Girlich (148)	Fransa	2013	133	13,5	14,2	12,7	-	36,1
Drew (141)	İngiltere	2013	421	-	-	16,6	-	12,5
Çakar A ve ark (134)	Türkiye	2013	155	1,4	2,8	6,3	84,6	-
Şemen ve ark. (165)	İstanbul	2013	37	-	2,7	-	70,6	-
Demir ve ark. (164)	Gaziantep	2013	95	-	3,5	8,7	86	-
Alp ve ark. (145)	Kayseri	2013	94	3,2	-	4,3	91,5	-
Aslı ve ark (161)	Afyon	2013	237	4,7	8,9	0,4	11	-
Güran ve ark. (162)	Adana	2014	81	1,2	2,5	7,4	44,4	-
Aşık ve ark (146)	Afyon	2014	22	18,1	27,2	-	100	-
Karatuna ve ark (145)	İstanbul	2014	190	-	0,7	16,7	74,3	0,7
Kutlu ve ark. (163)	Ankara	2015	112	-	8	1,8	82,1	-
Çiftçi ve ark. (166)	İsparta	2015	47	-	-	12,8	36,2	-
Çalışmamız	Antalya	2017	152	0,7	2	2	69,7	-

GSBL üreten suşlar, 1983 yılında ilk kez saptanmalarından itibaren geçen sürede dünyada önemli bir sorun haline gelmişlerdir. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda GSBL prevalansının ülkeye, bölgeye hatta kliniklere göre farklılık gösterdiği ve % 1-74 arasında değiştiği rapor edilmiştir.

Türkiye’de de, hastane izolatlarında GSBL sıklığının merkezler arasında farklılıklar gösterdiği ve % 45-80 arasında değiştiği bildirilmiştir (108,167). Ayrıca Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarındaki GSBL sıklığı sırasıyla % 22.5-36.8 ve % 24.4-63.7 arasında rapor edilmiştir (168). Türkiye’de hastane izolatu Gram negatif bakteriler ile yapılan çok merkezli çalışma olan MYSTIC çalışmasında, *K. pneumoniae*’ların % 40,5’inde, *E. coli*’lerin ise % 15,3’ünde GSBL varlığı saptanmıştır. Aynı çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında en fazla CTX-M (% 71.4), TEM (% 49.4) ve SHV’den enzimler (% 46.7) izlemiştir (169). MYSTIC çalışmasının 2003 yılı sonuçlarında ise GSBL oranı *E. coli* suşlarında % 31, *K. pneumoniae* suşlarında % 48 olarak bildirilmiştir (170). 2005 yılında tamamlanan ve Türkiye’nin değişik bölgelerinden altı merkezin katılımı ile gerçekleştirilen bir surveyans çalışması olan HİTİT çalışmasına göre, kan örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında GSBL oranı % 31.7 iken *K. pneumoniae*’da bu oran % 33.3 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada iki merkez dışında tümünde GSBL oranı *K. pneumoniae*’da daha yüksek olarak bildirilmiştir (171). 2007 yılında yapılan HİTİT-2 projesinde kan örneklerinden izole edilen *E. coli* GSBL %39.7, *K. pneumoniae* GSBL %38,8 olarak saptanmış ve zaman içinde artış olduğu gözlenmiştir (124). EARSS Türkiye’de en yaygın toplumsal kaynaklı GSBL üreten türlerin *E. coli*-*K. pneumoniae* ve bu türlerde en baskın beta-laktamaz tiplerinin SHV ve CTX-M olduklarını rapor etmiştir (172). Ulusal Hastane Enfeksiyonları Surveyans Sistemine (UHES) göre GSBL üreten *E. coli* prevalansı 2008 yılında %33,2, 2013 yılında %48,8 ve 2014 yılı itibariyle %58,8’e yükselmiştir. Benzer şekilde, *K. pneumoniae* 2008 yılında %40, 2013 yılında %49,6 ve 2014 yılı itibariyle %62,8 olarak rapor edilmiştir (173). Ülkemizde kan kültüründe üreyen *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında GSBL sıklığını araştıran çeşitli araştırmaların sonuçları Tablo 5.3. de gösterilmiştir

Tablo 5.2. Ülkemizde kan kültüründe üreyen *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında GSBL sıklığı ile ilgili son 10 yılda yapılan araştırmaların sonuçları

Araştırma veya Araştırmacı	Çalışma yılı	GSBL üretimi	
		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Çelebi ve ark. (174)	2003-2007	-	% 57
Çolakoğlu ve ark. (168)	2005-2007	% 36.8	% 31.2
Küçükbasmacı ve ark. (175)	2006-2007	% 37-40	% 29-38
Nazık ve ark. (176)	2006-2007	% 22.5	% 54.3
HITIT-2 (124)	2007	% 31.7	% 33.3
Almuhtaseb ve ark. (177)	2007-2008	% 33.9	% 24.4
Köksal ve ark. (126)	2001-2009	% 38.5	% 44
Sağlam D ve ark. (178)	2009	% 38.9	% 52
Baykal ve ark. (179)	2001-2009	% 26.2	% 61.4
Uyanık ve ark (180)	2008-2010	% 44	% 44

Avrupa ve Amerika ülkelerinde hastane kaynaklı en sık tespit edilen *bla* geni CTX-M, *E. coli* izolatların %90'ından fazlasında ve *K. pneumoniae* suşlarının %35-65,5'unda görülmektedir. SHV ve TEM-tipi genlerin prevalansı %1,7-42,9 arasında değişmekte olup, çoğunlukla *K. pneumoniae* suşlarında bulunmaktadır. Asya ülkelerinde CTX-M tipi genlerin bulunma oranları %38,2-55,5 arasında değişirken, en baskın genler SHV ve TEM olarak (%34,3-85,3) rapor edilmektedir (181).

Türkiye'de de, hastane kaynaklı en sık rapor edilen *bla*-geni CTX-M-tipi olup, bunu TEM ve SHV-tipleri izlemektedir (182). CTX-M β -laktamazlar Türkiye'de ilk kez 2001 yılında Lartigue ve ark. (183) tarafından bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* da bildirmişlerdir. Bayraktar ve ark. (184) Şubat-Temmuz 2009 arasında yaptıkları çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen hastane kaynaklı toplam 561 *Enterobacteriaceae* suşunda 77 sinde GSBL saptamış. *E. coli* izolatlarının % 95,7'sinde, *Klebsiella* spp. izolatlarının % 66,7'sinde *bla*CTX-M genleri tespit etmişler. Şubat-Ekim 2009 arasında Güran

ve ark. tarafından yapılan çalışmada GSBL üreten 310 *E. coli* suşunun 44'ünde (%14,2) CTX-M saptamışlardır (185). Nazik ve ark.'nın (182) yaptıkları bir çalışmada GSBL üreten *Klebsiella* spp. izolatlarında CTX-M sıklığını %84 olarak bulmuşlardır. Öksüz ve ark.'nın İstanbul'da yaptıkları bir çalışmada 28 *K. pneumoniae* ve 12 *E. coli* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M β -laktamaz oranları sırasıyla % 64.3, % 92.9, % 64.3 ve % 66.7, % 25, % 83.3 olarak bulunmuştur (186). Hoşoğlu ve ark. tarafından 2007 yılında yayınlanan çok merkezli bir çalışmada *E. coli* izolatlarındaki *bla*TEM ve *bla*SHV geninin oranı %65.1 ve %28.6 iken *K. pneumoniae*'da bu oranın %46.3 ve %48.8 olduğu saptanmıştır (187). Yapılan başka çok merkezli bir çalışmada ülkemizde GSBL pozitif *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında *bla*CTX-M pozitifliği %96.2, *bla*TEM %53.1 ve *bla*SHV pozitifliği %51.4 olarak bulunmuştur (188).

Bizim çalışmamızda ise 152 suşun 86'sında (%56,6) CTX-M saptandı. 107 *K. pneumoniae*, 28 *E. coli*, 10 *E. cloacae* ve bir *M. morganii* suşlarında CTX-M sıklığı sırasıyla %59.8, %67.9, %20 ve %100 tespit edildi. Üç *E. aerogenes* ile birer *K. oxytoca*, *C. brakii* ve *S. marcescens* suşlarında CTX-M tespit edilmemiştir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki CTX-M tipi GSBL'nin yayılımı pandemiktir ve günümüzde *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında 3.kuşak sefalosporinlere direncin ana sebebi olarak vurgulanmaktadır.

Bu sonuçlara göre hastanemizde daha etkili sürveyans çalışmalarının planlanması ve yapılması, geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerin dikkatli kullanılması, kolonize veya infekte hastaların izolasyon önlemlerinde daha titiz olunması gerektiğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇLAR

2010 – 2015 yılları arası Akdeniz Üniversitesi Hastanesi'nde yataklı servislerde çeşitli nedenlerle takip altında olan hastalardan elde edilen kan kültürlerinden otomatize sistem ile saptanmış, konvansiyonel yöntemler ile fenotipik doğrulama yapılmış olan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenem direnç genleri (OXA-48, NDM, VIM, KPC, IMP) ile GSBL direnç genlerinin (CTX-M...) varlığının PCR ile araştırılması amaçlanan bu çalışmaya 152 suş dahil edilmiştir. Bu çalışma sonucunda aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

✓ Çalışmamızda 152 [107 *K. pneumoniae*, 28 *E. coli*, 13 *Enterobacter spp* ile birer *K. oxytoca*, *M. organii*, *C. braaki*, *S. marcescens*] kan izolatın 113 karbapenemaz enzimi tespit edilmiş, 36'sı imipeneme, 48'i meropeneme ve 4 tanesi ertapeneme duyarlı olarak saptanmıştır. Ertapenem karbapenemaz varlığını taramada en duyarlı, imipenem ise en özgül karbapenem olarak bulunmuştur. Ertapenem, imipenem ve meropenem duyarlılık ve özgüllükleri sırasıyla (0,9823-0,0513), (0,8496-0,4872) ve (0,7257-0,4359) olarak saptanmıştır.

✓ Çeşitli antibiyotiklere karşı yapılan duyarlılık testi sonuçlarına göre: penisilin, β -laktam/ β -laktamaz inhibitörü kombinasyonları, sefalosporinler (sefepim hariç) ve ertapenem karşı %80 üzeri yüksek direnç oranları tespit edilmiştir. Siprofloksasin (%63,8), trimetoprim/sülfametaksazole (%62,5), meropenem (%63,2), imipenem (%60,5), sefepim (%60,5), gentamisin (%44,7) ve amikasin (%7,2) gibi antibiyotiklere karşı daha düşük boyutlarda direnç gözlenmiştir.

✓ 113 suşta (%74,3) karbapenem geni (105 OXA-48, üç NDM, üç VIM, bir IMP ve bir IMP + OXA-48) direnci saptanmıştır. Ek olarak izolatların hiçbirinde KPC saptanmamıştır. 107 *K. pneumoniae* suşunda OXA-48, NDM ve IMP sıklığı sırasıyla: %83.2, %1.9 ve %0.9, 28 *E. coli* suşunda OXA-48, NDM ve VIM sıklığı sırasıyla: %46.4, %3.6 ve %3.6, 10 *E. cloacae* suşunda OXA-48 ve OXA-48 + VIM sıklığı sırasıyla: %20 ve %10 olarak tespit edilmiştir.

✓ 86 suşta (%56,6) CTX-M saptanmıştır. 107 *K. pneumoniae*, 28 *E. coli* ve 10 *E. cloacae* suşlarında CTX-M sıklığı sırasıyla %59.8, %67.9 ve %20 tespit edilmiştir.

✓ Karbapenemlere dirençli olup herhangi bir direnç geni saptanmayan 39 suşta karbapenem direncinden sorumlu mekanizmanın porin kaybı ile birlikte GSBL ya da yüksek düzey AmpC varlığı olabileceği düşünülmüştür.

✓ Kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında 2010 yılında 6, 2011 ve 2012 yıllarında 10, 2013 yılında 30, 2014 yılında 28, 2015 yılında 29 karbapenemaz üreten dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu saptanmıştır. Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede yıllara göre karbapenemaz üretici sayısının prevalanslarının (2010 da % 15.8, 2011 de % 19.6, 2012 de % 27.8, 2013 te % 42.3, 2014 de % 41.8 ve 2015 te % 44.8) artışı anlamlı ($p<0,05$) olarak bulunmuştur. Bu durum hastanemizde gram negatif bakterilerde gözlenen karbapenem direncin 2010-2015 yılları arasında ne kadar dramatik bir değişim gösterdiğini açısından önemlidir.

✓ Hastaların izolatlarında kültür sonucu karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üretilmesinden önce mevcut aldıkları antibiyotik tedavileri incelendiğinde, kültür öncesi kolistin tedavisi alan 28 hastanın 25'inde OXA-48 direnç geni varlığı gözlenmiş, OXA-48 varlığı ve kolistin kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.008$).

✓ Ex olan 93 hastanın 70'inde OXA-48 direnç geni pozitifliği bulunmuştur. OXA-48 varlığı ve exitus arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.047$).

Bu sonuçlar ışığında; özellikle ciddi enfeksiyonlarla karbapenem duyarlılığının doğru ve mümkün olan en kısa sürede belirlenmesi, direnç genlerinin tanımlanması, bu etkenlerle enfekte olan hastaların erken ve uygun şekilde izole edilmesine ve uygulanacak olan akılcı antibiyoterapi ile mortalitenin azalmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

7.ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Enterobacteriaceae* Suşlarında Karbapenem Direnç Genleri ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Direnç Genlerinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Yöntemi İle Araştırılması

Günümüzde, insanlardaki toplum ve hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların en önemli etkenleri *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunmaktadır. Bu ailede yer alan bakterilerin mevcut antibiyotiklerle tedavisi hala zordur. Tedavide en sık kullanılan β -laktam antibiyotiklere karşı dirençte temel mekanizma β -laktamazlar, özellikle GSBL dir. GSBL üreten suşlarla oluşan ciddi enfeksiyonlarda tercih edilen karbapenemlerin yaygın kullanılması sonucu ise karbapenemaz üreten izolatlar gündeme gelmiş ve tedavi seçeneklerinde kısıtlılık ve tedavide güçlük yaşanmasına yol açmıştır. Ayrıca karbapenemaz üretiminin bu suşlarda hızla yaygınlaşması enfeksiyon kontrolünde acil bir problem haline gelmiş ve bu suşların hızlı bir şekilde tespit edilme gerekliliği ortaya koymuştur.

Bu çalışmada Akdeniz Üniversitesi Hastanesi yataklı servisler ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan 2010-2015 yılları arasında alınan Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiş kan kültürlerinden izole edilen, otomatize sistem ile saptanmış ve karbapenemlerden en az birine dirençli yada orta duyarlı bulunan *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenem direnç genleri (KPC, OXA-48, NDM, IMP, VIM) ve GSBL (CTX-M ...) varlığını PCR yöntemi ile saptamak ve yıllara göre dağılımları incelenerek hastanemizin epidemiyolojik verileri belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızda 152 [107 *K. pneumoniae*, 28 *E. coli*, 13 *Enterobacter spp* ile birer *K. oxytoca*, *M. organii*, *C. braaki*, *S. marcescens*] kan izolatında 113 karbapenemaz enzimi (105 OXA-48, üçer NDM ve VIM, birer IMP ve IMP + OXA-48) tespit edilmiştir. İzolatların 36'sı imipeneme, 48'i meropeneme ve 4 tanesi ertapeneme duyarlı olarak saptanmıştır. Ertapenem karbapenemaz varlığını tarama da en duyarlı, imipenem ise en özgül karbapenem olarak bulunmuştur.

İzolatların hiçbirinde KPC saptanmamıştır. *K. pneumoniae* suşlarında OXA-48, NDM ve IMP sıklığı sırasıyla: %83.2, %1.9 ve %0.9, *E. coli* suşlarında OXA-48, NDM ve VIM sıklığı sırasıyla: %46.4, %3.6 ve %3.6, *E. cloacae* suşlarında OXA-48 ve OXA-48 + VIM sıklığı sırasıyla: %20 ve %10 olarak tespit edilmiştir. 86 suşta CTX-M saptandı. *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *E. cloacae* suşlarında CTX-M sıklığı sırasıyla %59.8, %67.9 ve %20 tespit edilmiştir.

Kan kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında 2010 da 6, 2011 ve 2012 de 10, 2013 te 30, 2014 te 28, 2015 te 29 karbapenemaz üreten izolat saptandı. Ki-kare testi ile yapılan istatistiksel değerlendirmede yıllara göre karbapenemaz üretici sayısının prevalanslarının (2010 da % 15.8, 2011 de % 19.6, 2012 de % 27.8, 2013 te % 42.3, 2014 de % 41.8 ve 2015 te % 44.8) artışı anlamlı ($p<0,05$) olarak bulunmuştur. Bu durum hastanemizde gram negatif bakterilerde gözlenen karbapenem direncin 2010-2015 arasında ne kadar dramatik bir değişim gösterdiğini açısından önemlidir.

Hastaların kan kültür öncesi aldıkları antibiyoterapiler incelendi ve kültür öncesi kolistin tedavisi alan 28 hastanın 25'inde OXA-48 direnç geni varlığı gözlemlendi. OXA-48 varlığı ve kolistin kullanımı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.008$).

Ex olan 93 hastanın 70'inde OXA-48 direnç geni pozitifliği bulunmuştur. OXA-48 varlığı ve exitus arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmıştır ($p=0.047$).

Çalışmamız sonucunda hastanemizde *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenemaz ve GSBL (CTX-M ...) varlığı-prevalansları belirlenmiş olup, akılcı antibiyotik kullanımında yol gösterici olmuştur. Bu direnç genlerinin hızlı tespiti ile hastalara hem uygun antibiyoterapi hem de erken ve uygun şekilde izole edilerek maliyet ve mortalitenin azalmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: *Enterobacteriaceae*, karbapenemaz, PCR, CTX-M,

8. ABSTRACT

Investigation of Carbapenem Resistance Genes and Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Resistance Genes in Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* Strains Isolated from Blood Cultures by Polymerase Chain Reaction (PCR) Method

Currently, the most important causes of community- and hospital-acquired bacterial infections in humans are within the *Enterobacteriaceae* family. Treatment of bacteria within this family with existing antibiotics remains challenging. The main mechanism of resistance to β -lactams, the most commonly used antibiotics in therapy, involves β -lactamases, especially ESBLs. Carbapenemase-producing isolates have emerged as a result of the widespread use of carbapenems, which are the preferred antibiotics in severe infections caused by ESBL-producing strains, limiting the treatment options and leading to difficulties in treatment. Moreover, the rapid spread of the ability to produce carbapenemase among these strains has become an urgent problem in infection control and exposed the need for rapid detection of these strains.

The aim of this study is to detect the presence of carbapenem resistance genes (KPC, OXA-48, NDM, IMP, VIM) and ESBL (CTX-M etc.) with the PCR method in *Enterobacteriaceae* strains, which were isolated from blood cultures sent to the Central Laboratory from patients admitted to inpatient services or intensive care units between 2010-2015, detected by automated system, and resistant or moderately susceptible to at least one of carbapenems, and to establish the epidemiological data of Akdeniz University Hospital by studying their distributions throughout the years.

In this study, 113 carbapenemase enzymes (105 OXA-48, 3 NDM and VIM, 1 IMP and IMP + OXA-48) were detected in 152 blood isolates [107 with *K. pneumonia*, 28 with *E. coli*, 13 with *Enterobacter spp*, 1 with each of *K. oxytoca*, *M. morganii*, *C. braaki*, or *S. marcescens*]. Of the isolates, 36 were susceptible to imipenem, 48 to meropenem, and 4 to ertapenem. Ertapenem was the most sensitive in screening for the presence of carbapenemase; imipenem was

found to be the most specific carbapenem. No KPC was detected in any of the isolates. OXA-48, NDM, and IMP frequencies were found to be 83.2%, 1.9% and 0.9% in *K. pneumoniae* strains and 46.4%, 3.6% and 3.6% in *E. coli*, respectively; OXA-48 and OXA-48 + VIM frequencies were found to be 20% and 10% in *E. cloacae* strains, respectively. CTX-M was detected in 86 strains. The frequency of CTX-M in *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *E. cloacae* strains were 59.8%, 67.9% and 20%, respectively.

The number of carbapenemase-producing isolates among *Enterobacteriaceae* strains isolated from blood cultures were 6, 10, 30, 28, 29 in 2010, 2011 and 2012, 2013, 2014, and 2015, respectively. The increase in the prevalence of carbapenemase-producing isolates over the years (15.8% in 2010, 19.6% in 2011, 27.8% in 2012, 42.3% in 2013, 41.8% in 2014, and 44.8% in 2015) was found to be significant ($p<0.05$) based on the statistical evaluation with chi-square test. This is important to show how dramatically the carbapenem resistance observed in gram-negative bacteria has changed from 2010 to 2015 in this particular hospital.

The antibiotic therapies that the patients have received before blood culture were examined; OXA-48 resistance was observed in 25 of 28 patients who had received colistin treatment. There was a statistically significant link between the presence of OXA-48 and the use of colistin ($p=0.008$).

OXA-48 resistance gene was present in isolates of 70 of 93 patients who died. There was a statistically significant link between the presence of OXA-48 and mortality ($p=0.047$).

Having demonstrated the presence and prevalence of carbapenemase and ESBL (CTX-M, etc.) in *Enterobacteriaceae* strains in this hospital, the results of this study serve as a guide for the rational use of antibiotics. It is believed that the rapid detection of these resistance genes will contribute to the administration of appropriate antibiotic therapies as well as the reduction of cost and mortality by early and proper isolation.

Key words: *Enterobacteriaceae*, carbapenemase, PCR, CTX-M,

9. KAYNAKLAR

1. Jacoby GA and Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. New England Journal of Medicine, 2005; 352(4):380-391.
2. Budak S, Aktas Z, Erdem H. Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvaradan Kliniğe Karbapenemazlar. Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials, 2012;1:11
3. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF et al. Detection of KPC in *Acinetobacter spp.* in Puerto Rico. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2010; 54:1354–1357.
4. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1995; 39: p. 1211-1233
5. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem- Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese Hospital. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2008; 52:2014–2018.
6. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004; 112-124 ve 69-83
7. Bilgehan H. (2004). Klinik Mikrobiyoloji Tanı. *Enterobacteriaceae*. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. İzmir, 425-54.
8. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (2008). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, Cilt-2. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 1555-82.
9. Mutlu G, İmir T, Cengiz T, Ustaçelebi Ş, Tümbay E, Mete Ö (eds). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, Ankara, Güneş Kitabevi. 1999:471-517.
10. Özkuyumcu C, Dürdal US, Sancak B, Alp A, Sarıbaş Z, Çakar A. (2009). Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, Klinik Bakterioloji El Kitabı. *Enterobacteriaceae*. Editör: Özkuyumcu C. Güneş Kitabevi. Ankara, 103-121.

11. Cengiz T. *Entorobacteriaceae*. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti. 2004:446-451.
12. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Pater J, Srinivasan A. et al. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, (34)1–14.
13. Bozkaya E. (2005). Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 51-70.
14. Kiraz N, Samastı M, Aygün G. (2011). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı Cilt-II. İstanbul Üni. Basım ve Yayınevi Müd. İstanbul, 887-916.
15. Yazgan AS. *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* türlerinden elde edilen lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinlerin bazı hastane enfeksiyonları üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enst., Mühendislik ve Fen Bilimleri Enst., Biyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli, 2010
16. Fraser LS, Arnett M, Sinave PC. (2009). *Enterobacter* Infections, e medicine from WebMD.
17. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckanberger PC, Winn WC (eds). The *Enterobacteriaceae*. Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Philadelphia: JB Lippincott, 1997:171
18. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 1 2.baskı İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002:182-93
19. Gülay Z. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. ANKEM Dergisi. 2003;17(3):192-204.
20. Kfoury JNS, Araj GF. Recent development in beta-lactamases and extended spectrum beta-lactamases. *British Journal Medicine*. 2003;327:1209-13

21. Opal SM, Medeiros AA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. 6th edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc. 2005:253-70
22. Erişim adresi: <http://dragon.klte.hu/~gundat/betalaca.htm> (erişim tarihi: 06/12/2015)
23. şenol E. Karbapenemler ve Monobaktamlar In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar Cilt 1 3.baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008:288-94
24. Oelschlaeger 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.
25. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55 (11): 4943–4960
26. Mülazımođlu L. 1986'dan Günümüze Karbapenemler, *Ankem Dergisi*. 2010;24(Ek 2):33-35
27. Akova M, Kayaalp SO. Beta-laktam Antibiyotikler 2, Sefalosporinler ve Diğerleri. Kayaalp SO. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş 10. Baskı. Ankara 2002:245-6
28. Alhan E. Yeni Karbapenemler. *J Pediatr Inf*. 2011;5:90-4
29. Sundelof JG, Hajdu R, Gill CJ, Thompson R, Rosan H, Kropp H. Pharmacokinetics of L-749,345, a long-acting carbapenem antibiotic, in primates. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(8):1743-8
30. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K (2010). Hydrolysis and inhibition profiles of β -lactamases from molecular classes A to D with doripenem, imipenem, and meropenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54: 565–569.
31. Gür D. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları. İçinde, Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, ed. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2008:39-45

32. Sanders CC. Beta-lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis*. 1992;14:1089-99.
33. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis*. 1991;(78):7-16.
34. Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis*. 1992;15:824-39
35. Webber MA, Piddock LJ. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003;51:9-11.
36. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*. 1995;8(4):557-84.
37. Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1991;35(4):1093-98
38. Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, Reglier PH, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2007;13:315-7
39. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41:223-32.
40. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*. 2002;8:321-33.
41. Abraham EP, Chain E (1940). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature* 146: 837.
42. Bush K (2010). Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care* 14(3):224-231.
43. Özsoy FM, Öncül O, Yıldırım A, Pahsa A. genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar: klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora Dergisi*. 2001;6:3-21
44. Medeiros AA. Cooperative evolution of mechanisms of beta-lactam resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000;6(3):27-33

45. Bush K, Fisher JF (2011). Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annual Review of Microbiology* 65: 455-478.
46. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi*. 1996;1:80-6.
47. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical infectious diseases an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1997;24 (1):19-45.
48. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5407-13.
49. Hancock RE. Resistance mechanisms in pseudomonas aeruginosa and other nonfermentative gram negative bacteria. *Clin. Infect Dis*. 1998;27(1):93-9
50. Bush K, Jacoby GA (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (3): 969-976.
51. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamases gene bla_{spm-1} surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in recife. Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004:1406-9.
52. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME- 3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2006;50(10):3485-87
53. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Micro*. 2007;45(8):2723-5.
54. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging Infectious. Diseases*. 2006;12 (8):1209-13.

55. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;12(9):826-36.
56. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane infeksiyonları. 1997;1:38-45
57. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. Clin Infect Dis. 2001;32:1085-9.
58. Bal Ç. Beta-laktamazlar: güncel durum. Flora. 2003;8(2):111-23.
59. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob. Agents Chemother. 1991;35:147-51.
60. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-beta-lactamase found in clinical isolate of *Serratia marcescens* that show imipenem resistance. Antimicrob. Agents Chemother. 1994;38:71-8.
61. Erişim adresi: www.lahey.org/studies (erişim tarihi: 07/12/2015)
62. Struelens MJ, Monnet DL, Magiorakos AP, Santos O'Connor F, Giesecke J. The European NDM-1 Survey Participants. New Delhi metallo-beta-laktamaz 1- producing *Enterobacteriaceae*: emergence and response in Europe. 2010;15(46):pii19716.
63. Lauretti L, Riccio L, Mazzariol G, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta- lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1584-90.
64. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perili M, Coli A et al. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. J. Clin. Microbiol. 2002;40:4051-5.
65. Jacoby GA. AmpC β -lactamases Clin. Microbiol Rev. 2009;22(1):162-182

66. Erişim adresi: www.eucast.org/resistance_mechanisms (erişim tarihi: 08/12/2015)
67. Nordmann P, Poirel L (2013). Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 68 (3): 487-489.
68. Miriagou V, Cornaglia G, Galani I, Giske CG, Nordmann P, Canton R et al (2010). Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clinical Microbiology and Infection* 16 (2): 112-122
69. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>
70. Canton R, Canut A, Morosini MI, Oliver A (2014). Breakpoints for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: is the problem solved? *Enfermedades infecciosas y microbiología cl nica* 32 (4): 33-40.
71. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology and Infection* 18 (5): 432-438.
72. Cohen SJ, Leverstein-Van Hall MA. (2010). Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 36(3):205-10.
73. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(2):306-25.
74. Stuart JC, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party On The Detection Of Highly Resistant Microorganisms (2010). Guideline for phenotypic screening an confirmation of carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *International J. of Antimic. Agents* 36 (3): 205-210
75. 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 (4): 1631-1639.

76. 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
77. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Jacobs MR. Et al (2010). Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 48(12):4417-25.
78. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74:88–90
79. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1791–8
80. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J et al. Outbreak of carbapenem-resistant *P. aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *Journal of clinical microbiology.* 2004;42 (11):5094-101.
81. Badur S, Horasanlı SD. Enfeksiyon hastalıklarında yeni tanı yöntemleri In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M(eds). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 1.Cilt, 3.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008:177-95
82. Hayden RT. In Vitro Nükleik Asit Amplifikasyon Teknikleri In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA et al. (Çeviri: Tekeli A, Ustaçelebi Ş.). *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı Prensipleri ve Uygulamalar*, Ankara: Palme yayıncılık, 2006:43-69
83. 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.
84. 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.

85. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Maramou-Lada E, Miriagou V. et al (2010). Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *Journal of Microbiological Methods* 83 (2): 185-187.
86. Naas T, Cuzan G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC-2 carbapenemases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(8):3086-92
87. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J Antimicrob Agents*. 2010;36(3):8-14.
88. Nordmann P *et al*. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(9):821-830.
89. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolysing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect. Dis*. 2000;6:84-5
90. Aktas Z, Satana D, Kayacan Ç, Özbek B, Gürler N, Soner A et al. Carbapenem resistance in Turkey: Repeat report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and first report on IMP-1 beta-lactamase in *Escherichia coli*, *African Journal of Microbiology Research*. 2012;6(17):3874-78
91. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006;12:695- 96.
92. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Now in Turkey, *Antimicrob. Agents Chemother*. 2012;56(5):2784-5.
93. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities MMWR. *Morbidity and mortality weekly report*. 2009;58 (10):256-60

94. Albiger B *et al.* Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Euro Surveill 2015;20:pii=30062.
95. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. 2. Baskı, Bilimsel Tıp Yayınları, Ankara 2012.
96. Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Infection, Genetic and Evolution 11, 2011; 1499-1504
97. Gülay Z. Antibakteriyel İlaçların Etki Mekanizmaları. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Sistemlere Göre Enfeksiyonlar. 3. Baskı 2008.227-42
98. Köse Ç. Çoklu ilaç dirençli gram negatif bakteri infeksiyonları, epidemiyoloji ve tanı. Hastane Enfeksiyonları Dergisi 2013;17(1):89-93
99. Rodriguez-Bano J, Cisneros JM. (2008) Community infections caused by extended spectrum beta lactamase producing *E.coli*. Arch Intern Med, 168, 1897-1902.
100. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001; 14: 933-51.
101. Nordmann P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel-Briand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1993; 37: 962-9.
102. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimic. Agents Chemother 1993; 37: 1637-44.
103. Dağlar G, Öngüt G. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi 2012; 1: 1-9
104. Öcal D. Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. Ankem 2012;26(3):154-64.
105. Gür D. Yeni Direnç Mekanizmaları ve Rutin İnvitro Testlerin Kliniğe Yansıması. İnfeksiyon Dünyası Dergisi 2012.

106. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- third Informational supplement. 2013 M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute.
107. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. Yeni ve yeniden gündeme gelen enfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004; 13-26.
108. Durmaz R, Durmaz B, Koroglu M, Tekerekoglu MS. Detection and typing of extended-spectrum beta-lactamases in a clinical isolates of family *Enterobacteriaceae* in a medical center in Turkey, Microb Drug Resist 2001; 7 (2): 171-5.
109. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. (2001) Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: Results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 39 (2), 125-127.
110. Woerther PL, Burdet C, Chachaty E, Andremon A. (2013): Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 4, 744 –758.
111. Leistner R, Meyer E, Gastmeier P, Pfeifer Y, Eller C, Dem P, Schwab F. (2013): Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia Coli*. An Exploratory Case-Control Study. *PLoS ONE*, 8, 9, e74323.
112. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. (2008) *Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne Pennsylvania, USA*
113. Durmuş G. Enfeksiyon Hastalıkları Servisinde Üst Üriner Sistem Enfeksiyonu Tanısıyla İzlenen Hastalarda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimine Neden Olan Risk Faktörlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Enfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, Edirne, 2009

114. Akova M. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), ANKEM Derg 2004; 18 (Ek 2): 98-103.
115. Çetin ES, Demirci M, Kaya S, ve ark. Kan örneklerinden izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 2006;36(1):20-24
116. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin. 2010;15(46)
117. Özger HS, Karaşahin Ö, Telli G, Gaygısız G, Civil F, Dizbay M. Nozokomiyal *Klebsiella* Türleri Arasında Karbapenem Direnç Sıklığı ve Fenotipik Yöntemlerle Direncin Değerlendirilmesi. Flora dergisi. 2012;17(3):103-10
118. Alışkan HE, Çolakoğlu Ş, Bostanoğlu E, Turunç T, Göçmen JS. İki yıllık süreçte yapılan Modifiye Hodge Testi Sonuçlarının irdelenmesi, Ankem Dergisi. 2011;25(3):169-72.
119. Perçin D, Çolakoğlu S, Durmaz S, Ekincioglu P. Rektal Sürüntü Örneklerinde Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Taranmasında Klasik Yöntemlerle Ertapenemli EMB Besiyerinin Karşılaştırılması, Mikrobiyol Bul.2012;46(4):546-52.
120. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2013; 62:165.
121. Vatopoulos A. High rates of metallo-b-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. Euro Surveill 2008;13: pii: 8023.
122. Baroud M, Dandache I, Araj GF, Wakim R, Kanj S, Kanafani Z, Khairallah M, Sabra A, Shehab M, Dbaiibo G, Matar GM. (2013). Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *K.pneumoniae* ve *E.coli* isolates at a tertiary care

centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. International Journal of Antimicrobial Agents; (41), 75-79.

123. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59: 453-7. Epub 2007.09.25
124. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogunc D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gulay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktaş Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupinar B, Darka O, Akgun Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Berktaş M, Yaman G. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. J Chemother 2009;21:383-9. Epub 2009/07/23.
125. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 97 <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARSNet/Pages> (erişim tarihi: 09/12/2015)
126. Köksal F, Sirkebasan S, Ak K, Küçükbasmacı Ö, Samastı M. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin prevalansı ve antimikrobiyal direnç paternleri. 39(1-2), 35.
127. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları, Erciyes Tıp Derg, 33(3): 189-196.
128. Yılmaz N, Ağuş Nİ, Köse Ş, Yurtsever SG, Öner Ö. (2009). Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg., 39(3-4),80-84
129. Eser KÖ, Uludağ HA, Ergin A, Boral B, Şener B, Hasçelik G. (2014). İnvazif enfeksiyonlara neden olan GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenem direnci. Mikrobiyol Bul., 48(1), 59-69.

130. Aytar AA, Çalışkan E, Güven BG, Kaş E. (2014). Kan Kültürlerinden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve bazı antibiyotiklere direnç oranları. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP- 21, 138
131. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palu G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. Gut Pathog 2014; 6:13.
132. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging beta-lactamases in Gram-negative bacilli. Int J Antimicrob Agents 2013; 41(2): 99-109.
133. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. Euro Surveill 2013; 18(31). pii: 20549.
134. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Özhak Baysan B. ve ark. Türkiye’de 2014 Yılı İçinde İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni 2016; 50(1): 21-33
135. Falagas ME, Maraki S, Karageorgopoulos DE, Kastoris AC, Mavromanolakis E, Samonis G. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. Int J Antimicrob Agents, 2010; 35: 240-3.
136. Kilic A, Aktaş Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC. Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolates in Turkey. Annals of Clinical & Laboratory Science, 2011; 41:2-11.
137. Yang Q, Wang H, Sun H, Chen H, Yingchun XU, Chen M. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 54(1): 573-7.

138. Doyle D, Peirana G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JDD. (2012). Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*; 50(12): 3877-80.
139. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, Natoli S, Altieri A, Bossa MC, Minelli S, Leonardis F, Favalli C. (2010). Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC research notes*; 3: 40.
140. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(5):413–31.
141. Drew RJ, Turton JF, Hill RLR, Livermore DM, Woodford N, Paulus S, Cunliffe NA. (2013). Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a UK paediatric hospital. *Journal of Hospital Infection*; 84: 300-304.
142. Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann GS. (2012) Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a Commercial Multiplex PCR. *J.Clin. Microbiol.*;50(9): 3315-19.
143. Kuşucu MA, Ailikan M, Aygün G, Mete B, Yemiçen M, Balkan II, Tabak F, Öztürk R, Can F, Midilli K. Türkiye’de ilk blaKPC pozitifliği. *Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Aydın, Türkiye, Kongre Kitabı, Sözel sunum özetleri, 2012, s:207*
144. Alp E, Perçin D, Çolakoğlu S, Durmaz S, Kürkçü CA, Ekicioğlu P, Güneş T. (2013). Molecular Characterization of carbapenem-resistant *K.pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *Journal of Hospital Infection*; (84):178-180.
145. Karatuna O, Akyar I, Okullu ÖS, Ünübol N, Kaya DE, Güngörürler E, Kocagöz S, Kocagöz T. (2014). *E.coli* ve *Klebsiella* kökenlerinde karbapenem direncine neden olan mekanizmaların araştırılması: NDM-1’in sessiz yayılımı. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. 27-28. Nisan, İstanbul.
146. Aşık G, Keşli R, Demir C, Yoldaş Ö, Çetinkaya Ö. (2014). Karbapenem dirençli *K. penumoniae* izolatlarının genotipik özelliklerinin araştırılması.

11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. 27-28. Nisan, İstanbul, PP-43, 165.
147. Demir Y, Zer Y, Karaoğlu 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.
148. Girlich D, Halimi D, Zambardi G, Nordmann P. (2013). Evaluation of E-test strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.
149. Dortet L, Cuzon G, Nordmann P. Dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in France, 2012. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (3): 623-627.c
150. Gacar GG, Midilli K, Kolaylı F, Ergen K, Gündes S, Hosoglu S, Karadenizli A, Vahaboglu H. Genetic and Enzymatic Properties of Metallo β -Lactamase VIM-5 from a Clinical Isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2005; 11: 4400–4403.
151. Altındış M, Kılıç A, Baysallar M. Karbapenemaz genlerinin(KPC, NDM, VIM, NDM) hızlı tanısı. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-41, 163.
152. Aksu N, Baran I. New Delhi Metallo beta laktamaz (NDM-1) oluşturan bir *Klebsiella pneumoniae* olgusu, 1.Klimud Günleri Gap İllerinde Yaygın Görülen Enfeksiyonlar,13-14 Haziran,2013; Şanlıurfa, Türkiye, 27.
153. Yanık K, Emir D, Eroğlu C, Karadağ A, Güney AK, Günaydın M. (2013). Karbapenem dirençli gram-negatif izolatlarda New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz-1 (NDM-1) varlığının PCR ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul*; 47(2): 382-384.
154. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2004, 2: 15–22.
155. Azap O, Otlı B, Yesilkaya A, Yakupogullari Y. Detection of OXA-48-like Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology. *Balkan medical journal*. 2013;30(2):259-60

156. Biçmen M, Sarı A, Gülay Z. 2004-2012 Yılları Arasında Kan Kültürlerinden Üretilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Karbapenem Direncinin ve Bundan sorumlu Moleküler Mekanizmaların Araştırılması,10.Antimikrobik Kemoterapi Günleri;20-22 Nisan, 2012; İstanbul, Türkiye, P 47
157. Şemen V. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Karbapenemaz Varlığı ve Tiplerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2013
158. Aşık G, Er H, Şahin M. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında OXA-48 geninin varlığının araştırılması,10.Antimikrobik Kemoterapi Günleri;20-22 Nisan, 2012;İstanbul, Türkiye, P 16.
159. Nazik H, Ongen B, Ilktac M, Aydın S, Kuvat N, Sahin A, Yemisen M, Mete B, Durmus MS, Balkan II, Yıldız I, Ergul Y. Carbapenem resistance due to Bla(OXA-48) among ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a university hospital, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2012; 43: 1178-85.
160. Nazik H, Aydın S, Albayrak R, Bilgi EA, Yıldız I, Kuvat N, Keleşoğlu FM, Pakasticalı N, Yılmaz F, Ongen B. 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.
161. Bulut A. *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Karbapenem Direnci ve Dirençten Sorumlu Enzimlerin Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Afyonkarahisar, 2014
162. Güran M. Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Gram Olumsuz Basillerde Karbapenem Direncinin Moleküler Analizi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana, 2014
163. Kutlu HH. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram Negatif Enterik Bakterilerde Karbapenemaz Varlığının ve Tiplerinin Araştırılması.

- Uzmanlık Tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2015
164. Demir Y. Karbapenemlere Dirençli *Enterobacteriaceae* Üyesi Bakterilerde VIM, IMP, NMD-1, KPC ve OXA 48 Enzimlerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep, 2013
165. Şemen V. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Üyelerinde Karbapenemaz Varlığı ve Tiplerinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, 2013
166. Çiftçi E. Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* Suşlarındaki Karbapenemaz Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Isparta, 2015
167. Demirdağ K, Kizirgil A, Özden M, Kalkan A, Felek S, Toraman ZA. Hastane ve toplum kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığının araştırılması, ANKEM Derg 2001;15 (4):748-52.
168. Çolakoğlu Ş, Turunç T, Alışkan H, Demiroğlu YZ, Timurkaynak F, Arslan H. Kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında antibiyotik duyarlılığı, “Gür D (ed): 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri” Program ve Özet Kitabı s.220-1, Türk Mikrobiyol Cem. No: 57, İstanbul 2008.
169. Eraksoy H, Başustaoglu A, Korten V, et al. Susceptibility of bacterial isolates from Turkey. A report from the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) program, J Chemother 2007; 19 (6): 650-57
170. Gülay Z, Köksal İ, Gür D, Başustaoglu AC. Gram negatif basillerde antibiyotik direnci. 2003-2005 yılında ülkemizdeki durum. 7. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve Özet Kitabı, s.161-76, Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Yayını No.54, İstanbul, 2006.

171. Gür D, Gülay Z, Arıkan Akan Ö, Aktaş Z, Bal Kayacan Ç, Çakıcı Ö, Eraç B, Gültekin M, Ögünç D, Söyletir G, Ünal N, Uysal S. Türkiye’de Hastane İzolatı Gram-Negatif Bakterilerde Yeni Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç ve GSBL tipleri: Çok Merkezli HİTİT Sürveyansının Sonuçları, Mikrobiyol Bul 2008; 42 (4): 537- 44.
172. Cantón, R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F. ve Coque TM. (2008): Prevalence and spread of extended-spectrum beta lactamase producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect. Suppl*, 1, 144-153.
173. www.uhes.saglik.gov.tr ([erişim tarihi: 10/12/2015](http://www.uhes.saglik.gov.tr))
174. Çelebi S, Tuncer E, Hacımustafaoğlu M, Özkaya G. Çocuklarda Genişlemiş Spektrumlu β -laktamaz Üreten *Klebsiella* Kan Akımı Enfeksiyonunda Risk Faktörleri ve Klinik Sonuçları: Beş yıllık çalışma, Çocuk Enf Derg 2008; 2 (3) : 84-9.
175. Küçükbasmacı Ö, Çalışkan Algingil R, Hamaña Ö ve ark.: Kan örneklerinden üretilen Gram negatif çomakların antibiyotiklere duyarlılıkları, Türk Mikrobiyol Cem Derg 2007; 37(4):201-3.
176. Nazik H, Oksuz L, Aktaş Gokalp A, Karayay S, Bal Kayacan C, Gürler N: İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’nda kan kültüründen izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları, “Gür D (ed): 8. Antimikrobik Kemoterapi Günleri” Program ve Özet Kitabı s. 224-5, Türk Mikrobiol Cem yayını No: 57, İstanbul, 2008.
177. Almuhtaseb M. Kan Kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella Pneumoniae* Kökenlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Sıklığı. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul 2008.
178. Sağlam D. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia Coli* ve *Klebsiella Pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı.

Uzmanlık Tezi, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, 2012

179. Baykal A, Çöplü N, Şimşek H, Esen B, Gür D. Kan İzolatı *E. coli* ve *K. pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz, KPC-Tip Karbapenemaz ve Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni, Nisan 2012; Cilt: 46(2): 159-69.
180. Uyanık M H, Hancı H, Yazgı H, Karamiş M. Kan kültürlerinden soyutlanan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL sıklığı ve ertape- nem dahil çeşitli antibiyotiklere in-vitro duyarlılıkları, ANKEM Derg 2010; 24(2):86-91.
181. Storberg V. (2014): ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa - a non-systematic literature review of research published 2008-2012. *Infect Ecol Epidemiol*, 4, 20342, <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v4.20342>.
182. Nazik H, Bektore B, Ongen B, İlktaç M, Ozyurt M, Kuvat N, Baylan O, Kekulluoglu H, Haznedaroglu T. ve Kelesoglu FM. (2011): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Urinary Isolates from Two Teaching Hospitals in Turkey: Coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type β -lactamases. *Trop J Pharm Res* 10, 3, 325–333.
183. Lartigue MF, Poirel L, Heritler C, Tolün V and Nordmann P. First description of CTX-M-15 producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey J Animicrob Chemother. 2003; 52(2):315-6.
184. Bayraktar B, Toksoy B, Bulut E. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten Gram negatif bakterilerde blaCTX-M genlerinin araştırılması. *Microbiol Bul*,2010;44:187-196.
185. Güran M, Akçimen B, Gökmen T, Yaman A, Köksal F. Characterization of CTX-M type extended spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Southern Turkey: The first report of CTX-M-14 producing *Escherichia coli* from Turkey. *Afr J Microbiol Res*, 2013;7(7): 551-556.

186. Öksüz L, Gürler N: *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. Mikrobiyol Bul, 43: 183-194, 2009.3
187. Hoşoğlu S, Gündeş S, Kolaylı F, Demirdağ K, Günaydın M, Altındış M, Çaylan R, Uçmak H: Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. Indian Journal of Medical Microbiology, 25(4): 346-50, 2007.
188. Nazik H, Öngen B, Sarıkaya A, Kuvat N, İlktaş M. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M Tipi Beta-Laktamaz Sıklığı ve Antibiyotik Ko-rezistansı. Medsci, Cilt: 31, Sayı:2, 2011.

10. EKLER

EK 1. Olgu Takip Formu

KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERİACEA ŞUŞLARININ KARBAPENEM DİRENÇ GENLERİ İLE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETALAKTAMAZ (GSBL) DİRENÇ GENLERİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU YÖNTEMİ İLE ARAŞTIRILMASININ OLGU TAKİP FORMU			
Hasta Adı Soyadı:		Dosya No:	
Servis veya Yoğun Bakım Ünitesine	Doğum Tarihi:	K	E
Yatış tarihi:			
Numunenin gönderildiği bölüm:	Numunenin alındığı tarih:		
Bilinen kronik hastalığı:			
☐ Diabetes Mellitus		☐ Kronik Böbrek Hastalığı	
☐ Kronik Karaciğer Hastalığı		☐ Kronik Akciğer Hastalığı	
☐ Hematolojik Malignite		☐ Solid Organ Malignite	
☐ Kemik İliği Nakli		☐ Solid Organ Nakli	
☐ HIV Enfeksiyonu		☐ Diğer:.....	
Kan kültüründen etken patojenin identifikasyonu öncesi klinik veriler:			
☐ YBÜ yatış öyküsü		☐ Santral venöz kateter varlığı:	
☐ Son 2 hafta içerisinde cerrahi uygulanma öyküsü			
☐ KT / RT öyküsü		☐ Nötropeni	
Kan kültüründen etken patojenin identifikasyonu öncesi mikrobiyolojik veriler:			
☐ Önce kan kültürü / kültürleri var mıydı ? Varsa etken:()			
☐ Önceki kan kültüründe GSBL üreten mikroorganizma varlığı			
☐ Kan kültürü dışında başka örneklerde GSBL varlığı			
☐ Kan kültürü dışında başka örneklerde Karbapenemaz varlığı			
☐ Başka bir infeksiyon odağı varlığı			
Varsa infeksiyon odağının yeri: ☐			
☐ Bilinen son 30 gün içerisinde oral / İV antibiyotik kullanma öyküsü			
☐ Antibiyotikğin niçin başlandığı: Etken spesifik ☐ , ampirik ☐ , profilaktik ☐			

Kan kültürlerinden etken patojenin identifikasyonu sonrası veriler:

- | | |
|--|---|
| ☐ <i>Escherichia coli</i> . | ☐ <i>Klebsiella pneumoniae</i> |
| ☐ <i>Klebsiella oxytoca</i> | ☐ <i>Citrobacter braakii</i> |
| ☐ <i>Enterobacter aerogenes</i> | ☐ <i>Enterobacter cloacae</i> |
| ☐ <i>Morganella morganii</i> | ☐ <i>Serratia marcescens</i> |
| ☐ GSBL varlığı | ☐ Karbapenemaz varlığı |

Karbapenemaz Enzim Direnç Geni:

Genişlemiş Spektrumlu Betalaktamaz Direnç Geni:

Sonuç: ☐ Taburcu ☐ Eksitus