

**T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ENTEROBACTERIACEAE KLİNİK İZOLATLARINDA
KARBAPENEMAZ VARLIĞININ FENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

Dr. Emrah AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2013

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ENTEROBACTERIACEAE KLİNİK İZOLATLARINDA
KARBAPENEMAZ VARLIĞININ FENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Emrah AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ

ESKİŞEHİR
2013

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr. Emrah AYDIN'a ait "*Enterobacteriaceae*" klinik izolatlarında karbapenemaz varlığının fenotipik yöntemlerde araştırılması adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında tıpta uzmanlık tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih:

Jüri Başkanı	Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Prof. Dr. Gül DURMAZ Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Üye	Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte KurulununTarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Bekir YAŞAR

Dekan

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren her konuda rahatlıkla ulaşıp danıştığım değerli hocam Doç. Dr. Abdurrahman KİREMİTÇİ'ye, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Filiz AKŞİT'e, Prof. Dr. Gül DURMAZ'a, Prof. Dr. Yurdanur AKGÜN'e, Prof. Dr. Tercan US'a, Doç. Dr. Nihal DOĞAN'a, Doç. Dr. Nilgün KAŞİFOĞLU'na, Doç. Dr. Yasemin ÖZ'e; bölümümüzde birlikte çalıştığım arkadaşlarım Dr. Semra ÖZ'e ve Dr. Egemen GÖKBOLAT'a yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

ÖZET

Aydın, E. *Enterobacteriaceae* klinik izolatlarında karbapenemaz varlığının fenotipik yöntemlerle araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2013. Karbapenemler beta-laktam antibiyotikler arasında en geniş aktivite spektrumuna sahip ilaçlardır. Ancak günümüzde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonları dünya çapında bildirilmektedir. Bu direncin esas nedeni, genetik olarak aktarılabilir karbapenemaz üretimidir. Bu çalışmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında klinik örneklerden izole edilen ve Phoenix (BD Diagnostics, ABD) otomatize sistemi ile karbapenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde artış saptanan 190 *Enterobacteriaceae* suşundan 104'ünde Etest (bioMerieux, Fransa) yöntemi ile MİK değerlerinde artış olduğu doğrulanmıştır. Bu suşlar üzerinde yapılan fenotipik testler ile, karbapenem direnç mekanizması olarak; 33'ünde (%31,5) "genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) + OXA-48 ve benzeri profil", 26'sında (%25) OXA-48 ve benzeri profil, 18'inde (%17,5) metalo-beta-laktamaz (MBL), 13'ünde (%12,5) "KPC+MBL", 13'ünde (%12,5) "GSBL+Porin kaybı" ve 1'inde (%1) KPC saptanmıştır. Ayrıca Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesinde çeşitli servislerde yatmakta olan 210 farklı hastadan alınan rektal sürüntü örnekleri 1 µg/ml dozda imipenem içeren EMB agar besiyerlerine ekilmiş, izole edilen 16 suşta Etest yöntemi ile karbapenem MİK artışı olduğu doğrulanmıştır. Bu suşlar üzerinde yapılan fenotipik testler ile, karbapenem direnç mekanizması olarak; 11'inde (%5) OXA-48 ve benzeri profil, 3'ünde (%1,5) "KPC+MBL", 2'sinde MBL (%1) mekanizması saptanmıştır. Bu çalışmaya göre; otomatize sistem sonuçlarına göre karbapenem MİK değerlerinde artış saptanan izolatlarda bu artışın doğrulanması ve hastane içinde, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* prevalansının arttığı birimlerde karbapenem içeren besiyeri kullanılarak taşıyıcılık taraması yapılması mantıklı görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*, karbapenem direnci, karbapenemaz

ABSTRACT

Aydın E. Exploration of carbapenemase presence via phenotypic methods in clinical *Enterobacteriaceae* isolates. Eskisehir Osmangazi University Medicine of Faculty, Department of Clinical Microbiology, Eskisehir, 2013. Carbapenems have the widest spectrum of activity among beta-lactam antibiotics. However, today, carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* infections have been reported worldwide. The main cause of this resistance is the genetic transfer of carbapenemase genes. In this study, 104 of 190 *Enterobacteriaceae* strains which were isolated from clinical specimens at Eskisehir Osmangazi University Medicine of Faculty, Department of Microbiology and detected as having increased MIC values by Phoenix (BD Diagnostics, USA) automated system were confirmed as having increased MIC values by using Etest (bioMérieux, France) method. By using phenotypic methods on these strains, the mechanisms of carbapenem resistance have been detected as follows: At 33 strains (%31,5) as “extended spectrum beta-lactamase (ESBL) + OXA-48-like profile”, at 26 strains (%25) as OXA-48-like profile, at 18 strains (%17,5) as metallo-beta-lactamase (MBL), at 13 strains (%12,5) as “KPC+MBL”, at 13 strains (%12,5) as “ESBL+Porin loss” and at 1 strain (%1) as KPC. On the other hand, 210 rectal swabs collected from hospitalised patients at various services of Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine were plated on EMB agar media which contain imipenem at 1 µg/ml dose for each. Sixteen of isolated strains were confirmed as having increased carbapenem MIC values by using Etest method. By using phenotypic methods on these strains, the mechanisms of carbapenem resistance have been detected as follows: At 11 strains (%5) as OXA-48-like profile, at 3 strains (%1,5) as “KPC+MBL”, at 2 strains (%1) as MBL (%1). According to this study, confirmation of increased carbapenem MIC values detected by automated system and screening of the carriers by using carbapenem containing media at the units that have increased carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* prevalence, seem reasonable.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, carbapenem resistance, carbapenemase

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLOLAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi	3
2.1.1. Genel Özellikler ve Sınıflama	3
2.1.2. Virülans ve Antijenik Faktörler	4
2.1.3. Klinik Önem	4
2.2. Beta-laktam Antibiyotikler	5
2.2.1. Penisilinler	6
2.2.2. Sefalosporinler	8
2.2.3. Monobaktamlar	10
2.2.4. Karbapenemler	10
2.3. Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları	16
2.3.1. Antibiyotik Direncinin Genetik Mekanizmaları	17
2.3.2. Antibiyotik Direncinin Biyokimyasal Mekanizmaları	18
2.4. Karbapenem Direnci	26
2.4.1. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları	26
2.4.2. Karbapenemaz Üreticilerinin Epidemiyolojisi	31
2.4.3. Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacteriaceae</i> İdentifikasyonu	34
2.4.4. Karbapenemaz Üretici Bakteri Taşıyıcılığının Taranması	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM	42

3.1. İzolatların Tanımlanması	42
	Sayfa
3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	43
3.3. AmpC ve GSBL Üretiminin Saptanması	44
3.4. Karbapenemaz Üretiminin Saptanması	45
3.5. Karbapenem Direnç Mekanizmasının Tayini	46
3.5.1. “AmpC Beta-laktamaz+Porin Kaybı” Tayini	46
3.5.2. KPC Tayini	47
3.5.3. MBL Tayini	48
3.5.4. “KPC+MBL” Tayini	49
3.5.5. OXA-48 ve Benzeri Profil ve “GSBL+Porin Kaybı” Tayini	50
4. BULGULAR	51
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	78

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
APBA	3-Aminofenilboronik Asit
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DHP-I	Dehidropeptidaz-I
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DPA	Dipikolinik Asit
ECOFF	Epidemiyolojik Cut-off
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EMB	Eosin Methylene Blue
ESOGÜ	Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	US Food and Drug Administration
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
Inc	Incompatibility
IS	İnsersiyon Sekansı
KÜE	Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacteriaceae</i>
M	Molar
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption İonization-Time of Flight
MBL	Metalo-Beta-Laktamaz
MH	Mueller-Hinton
MHT	Modifiye Hodge Testi
MİK	Minimal İnhibitor Konsantrasyon
MİO	Motilite İndol Ornitin
mg/L	Miligram/Litre
µg/ml	Mikrogram/Mililitre
mm	Milimetre
MRSA	Metisilin-Rezistan <i>S. aureus</i>

MRSE	Metisilin-Rezistan <i>S. epidermidis</i>
NAG	N-Asetilglukozamin
NAM	N-Asetilmuramik Asit
OMP	Dış Membran Proteini
PBA	Fenilboronik Asit
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	Polymerase Chain Reaction
SF	Serum Fizyolojik
ST	Sekans Tipi
TSI	Triple Sugar Iron

ŞEKİLLER

	Sayfa
4.1. Disk difüzyon yöntemiyle karbapenem zon çapında azalma saptanan bir izolat	53
4.2. Etest yöntemiyle karbapenem MiK değerlerinde artış saptanan bir izolat	53
4.3. Modifiye Hodge testi pozitif saptanan iki izolat	56
4.4. Kombine disk yöntemiyle GSBL pozitif saptanan bir izolat	57
4.5. Kombine disk yönteminde kloksasilin ilavesiyle AmpC pozitif saptanan bir izolat	57
4.6. Kombine disk yönteminde EDTA ve DPA ilavesiyle meropenem zon çapında artışın görüldüğü bir MBL pozitif izolat	58
4.7. Kombine disk yönteminde PBA ilavesiyle meropenem zon çapında artışın görüldüğü bir KPC pozitif izolat	58
4.8. Temosilin Etest yöntemiyle MİK değeri >32 mg/L saptanan bir OXA-48 ve benzeri profil pozitif izolat	59

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin sınıflandırılması	3
2.2. Karbapenem grupları ve aktivite spektrumları	13
2.3. Beta-laktamazların sınıflandırılması	19,20
2.4. <i>Enterobacteriaceae</i> 'de karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazların sınıflandırılması	28
3.1. CLSI karbapenem sınır değerleri	42
3.5. Kombine disk yöntemleri ile yapılan fenotipik testlerin yorumlanması	47
4.1. İzolatların imipenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı	52
4.2. İzolatların meropenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı	52
4.3. İzolatların ertapenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı	52
4.4. Ertapenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu	54
4.5. İmipenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu	54
4.6. Meropenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu	55
4.7. Karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri veya azalmış zon çapı saptanan suşlarda fenotipik test sonuçları	60
4.8. Karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri saptanan suşlarda diğer antibiyotik duyarlılıkları	61

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesi doğal olarak bitkilerde, toprakta, suda, insan ve hayvanların bağırsaklarında bulunan geniş bir gram negatif basil ailesidir ve sık enfeksiyon sebebidirler (1). Beta-laktamlar insanlardaki bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır ve çoğu ülkede, gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en geniş antibiyotik grubudur (2). Ancak beta-laktam antibiyotiklerin artan sıklıkta kullanımları, bakterilerin ürettiği beta-laktamazlar yoluyla direncin dünya çapında yayılmasına ve sonuç olarak beta-laktamların etkilerinin azalmasına neden olmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı esas direnç mekanizması, bakteride ilacı inaktive eden beta-laktamaz enzimlerinin üretilmesidir (3). Karbapenemler beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip, hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir (4) ve giderek artan sıklıkta kinolonlar, aminoglikozidler, trimetoprim/sülfametoksazol ve diğer antibiyotiklere de dirençli hale gelen ve böylece “çoklu ilaç dirençli organizma” tanımını ortaya çıkaran genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretici organizmalar için genelde son çare ilaçlardır (5). Ancak karbapenemlere karşı da artan direnç şu an çok sayıda hastane ve toplum kökenli gram negatif basilde gözlenmektedir. Bu direnç esasen genetik olarak aktarılabilir karbapenemaz üretimine bağlıdır. Karbapenemleri hidrolize eden bu beta-laktamazlar, hemen hemen tüm beta-laktamları hidrolize edebilen en güçlü beta-laktamazlardır ve *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında dünya çapındaki yayılımları endişe yaratmaktadır (6).

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE)’nin sebep olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlı ve mortalite oranları yüksektir (7).

Yeni ve etkin anti-gram-negatif antibiyotik eksikliğinden dolayı, enfeksiyon kontrolü, çoklu ilaç dirençli gram negatif patojenlere karşı en önemli önlemdir. Enfeksiyon kontrolü, yeni enfeksiyonları ve dirençli patojenlerin yayılımını önleyebilir ve dolayısıyla antibiyotik kullanımı ihtiyacını azaltabilir (8). Klinik laboratuvarlarda KÜE’nin doğru identifikasyonu, yayılım ve enfeksiyonları önlemede ilk adımdır (7).

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen ve Phoenix otomatize sistemi (BD Diagnostics, Amerika Birleşik Devletleri [ABD]) ile karbapenem minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde *Clinical Laboratory Standards Institute*

(CLSI) kriterlerine göre artış saptanmış *Enterobacteriaceae* suşlarında karbapenemaz varlığı ve sınıfları fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae* Ailesi

2.1.1. Genel Özellikler ve Sınıflama

Enterobacteriaceae ailesinde çok sayıda cins ve tür bulunur (9). Yakın zamana kadar cins ve türler biyokimyasal ve antijenik analizler ile tanımlanırdı. Günümüzde moleküler tekniklerin kullanılması ile birçok yeni tür keşfedilmiş ve yeniden sınıflandırma önerilmiştir (1). Tablo 2.1.'de *Enterobacteriaceae* ailesinin sınıflandırılması gösterilmiştir.

Tablo 2.1. *Enterobacteriaceae* ailesinin sınıflandırılması (9)

KABİLE	CİNS	TÜR	KABİLE	CİNS	TUR
1.Escherichieae	<i>Escherichia</i>	<i>coli</i>	5.Klebsielleae (devam)		<i>gergoviae</i>
		<i>blatae</i>			<i>dissolvens</i>
		<i>vulneris</i>			<i>nimipressuralis</i>
		<i>fergusonii</i>			<i>asburiae</i>
		<i>hermanii</i>			<i>cancerogenus</i>
	<i>Shigella</i>	<i>dysenteriae</i>			<i>(taylorae)</i>
		<i>flexneri</i>			<i>hormaechei</i>
		<i>boydii</i>			<i>alvei</i>
		<i>sonnei</i>			<i>marcescens</i>
		<i>tarda</i>			<i>liquefaciens</i>
2.Edwardsielleae	<i>Edwardsiella</i>	<i>hoshinae</i>	<i>Serratia</i>	<i>rubidaea</i>	
3.Salmonelleae	<i>Salmonella</i>	<i>ictaluri</i>		<i>fonticola</i>	
4.Citrobacteriaceae	<i>Citrobacter</i>	<i>enterica</i>		<i>odorifera</i>	
		<i>bongori</i>		<i>plymuthica</i>	
5.Klebsielleae	<i>Klebsiella</i>	<i>freundii</i>		<i>ficaria</i>	
		<i>diversus(koseri)</i>	<i>Pantoea</i>	<i>agglomerans</i>	
		<i>amalonaticus</i>	<i>Proteus</i>	<i>mirabilis</i>	
		<i>pneumoniae</i> subsp.	6.Proteeae	<i>vulgaris</i>	
		<i>pneumoniae</i>		<i>penneri</i>	
		<i>pneumoniae</i> subsp.		<i>myxofaciens</i>	
		<i>ozaenae</i>		<i>Morganella</i>	<i>morganii</i>
		<i>oxytoca</i>		<i>Providencia</i>	<i>alcalifaciens</i>
		<i>pneumoniae</i> subsp.			<i>stuartii</i>
		<i>rhinoscleromatis</i>			<i>rettgeri</i>
<i>planticola</i>		<i>rustigianii</i>			
<i>terrigena</i>	7.Yersinieae	<i>Yersinia</i>		<i>pseudotuberculosis</i>	
<i>ornithinolytica</i>				<i>pestis</i>	
<i>Enterobacter</i>	<i>aerogenes</i>		<i>enterocolitica</i>		
	<i>cloacae</i>		<i>frederiksenii</i>		
	<i>agglomerans</i>		<i>kristensenii</i>		
	complex		<i>intermedia</i>		
	<i>amnigenus</i>		<i>ruckeri</i>		
	<i>sakazakii</i>		<i>aldovae</i>		

Enterobacteriaceae ailesi üyeleri 0,3-1 µm genişliğinde, 0,6-6,0 µm uzunluğunda gram negatif sporsuz, fakültatif anaerob basillerdir (9,10). Gram boyalı yaymalarda kokobasil şeklinde de görülebilirler. *Plesiomonas* cinsi hariç sitokrom oksidaz üretmezler. Tamamı glukozu fermente eder. *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus*

cinsleri hariç tümü nitratı nitrite indirger. *Klebsiella*, *Shigella* ve *Yersinia* cinsleri hariç tümü vücut sıcaklığında hareketlidir.

Çoğu, koyun kanlı agar ve çikolata agarda büyük, ıslak, gri koloniler oluşturur, bu nedenle bu besiyerlerinde birbirinden ayırt edilemezler. Ayrıca çoğu *E. coli* izolatı beta-hemolitiklidir.

Enterik patojenlerin olası identifikasyonu için MacConkey agar gibi selektif ve Hektoen enterik agar ve ksiloz-lizin deoksikolat agar gibi yüksek ölçüde selektif olan farklı besiyerleri bulunmaktadır. Bu besiyerleri laktoz ve sükröz gibi bir veya daha fazla karbonhidrat içerir. Fermentasyon varlığında pH azalmasına bağlı olarak besiyerinde renk değişikliği olur, non-fermentatif türlerde ise koloniler besiyerinin orijinal renginde kalırlar. Ayrıca Hektoen enterik agar ve ksiloz-lizin deoksikolat agarlarda H₂S oluşturan kolonilerde siyahlaşma görülür (9).

2.1.2. Virülans ve Antijenik Faktörler

Enterobacteriaceae türlerinin virülansını belirleyen faktörler tutunma (*adherens*), kolonizasyon, toksin üretme ve doku invazyonu yetenekleridir. Bazı türler antibiyotik direnç genleri sağlayan plazmitler taşır.

Bu ailenin çoğu üyesi, serolojik identifikasyonda kullanılabilen antijenlere sahiptir:

O antijeni (Somatik antijen) hücre duvarındaki ısıya dayanıklı antijendir.

H antijeni (Flagella antijeni) hareket sağlayan flagellanın yüzeyindeki ısıya duyarlı antijendir.

K antijeni (Kapsül antijeni) sadece kapsüllü türlerde bulunan ısıya duyarlı polisakkarittir. Örnekleri *E. coli*'de bulunan K1 antijeni ve *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype Typhi'de bulunan Vi antijenleridir (9).

2.1.3. Klinik Önem

Enterobacteriaceae ailesi üyeleri doğada yaygın olarak bulunur. Ayrıca *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* cinsleri hariç gastrointestinal kanalda yerleşirler. Sıklıkla kommensaldirler ve zarar vermezler ancak fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilirler. Sebep oldukları klinik enfeksiyonlara göre *Enterobacteriaceae* üyeleri iki geniş kategoriye ayrılabilir: 1) Fırsatçı patojenler 2) Primer patojenler

Enterobacteriaceae ailesi, klinik olarak önemli gram negatif basil izolatlarının %80'ini ve klinik mikrobiyoloji laboratuvarındaki klinik olarak önemli bakterilerin %50'sini oluşturur. Septisemi olgularının yaklaşık %50'sinden, üriner sistem enfeksiyonlarının %70'inden fazlasından ve bağırsak enfeksiyonlarının önemli bir kısmından sorumludur.

Fırsatçı patojenler hem insan, hem hayvanlarda sıklıkla bağırsak florasının bileşenidirler. Ancak bağırsak dışında ciddi fırsatçı enfeksiyonlara sebep olabilirler. Örneğin *E. coli*, sağlıklı bireylerde idrar yolu enfeksiyonu, septisemi, yara enfeksiyonu ve yenidoğanlarda menenjitte neden olabilir.

Salmonella enterica, *Shigella* spp. ve *Yersinia* spp. gerçek patojenler olarak kabul edilirler, çünkü insan gastrointestinal sisteminin normal florasında bulunmazlar. Bu organizmalar kontamine su ve gıda alımı veya başka kaynaklardan bulaş sonrası enfeksiyonlara neden olurlar (1,9).

Bakteri enfeksiyonlarında en yaygın tedavi beta-laktam antibiyotiklerdir (9).

2.2. Beta-laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler, kimyasal yapılarında ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvar sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur (11). Beta-laktam antibiyotiklerin bakteri hücrelerindeki hedefi, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon evresini katalize eden penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)'dir. Beta-laktam antibiyotikler bu enzimlerle bağlanarak enzimin kendi substratına bağlanmasını engeller, böylece duvar sentezi inhibe olur ve bakteri lizise uğrar (12).

Peptidoglikan veya murein tabakası da denen hücre duvarı, bakteriye şekil ve çevresel ozmotik basınç değişikliklerine dayanma gücü verir ve böylece bakteriyi lizisten korur.

Hücre duvar yapısı doğada eşsizdir ve disakkarit-pentapeptid alt birimlerinden oluşur. Disakkaritler, N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asittir (NAM). NAM moleküllerine bağlı olan aminoasit zincirleri arasında oluşan peptid köprüleri ile farklı tabakalar çapraz bağlanır. Çapraz bağlanma yapıya güç verir.

Gram pozitif bakterilerdeki peptidoglikan tabakası, gram negatif bakterilerdekine göre daha kalındır. Ayrıca gram pozitif bakteri hücre duvarı teikoik asitler içerir. Bazı teikoik asitler NAM'a, bazıları da hücre membranına bağlıdır.

Dış membran sadece gram negatif bakterilerde bulunur ve bakterinin çevreye karşı ilk bariyeri olarak işlev görür. Bu membran hidrofilik ve hidrofobik bileşiklere karşı primer geçirgenlik bariyeridir ve periplazmik boşluktaki esansiyel enzimleri ve diğer proteinleri tutar. Membran, lipopolisakkaritten oluşan çift tabakalı bir yapıdır. Lipopolisakkarit gram negatif bakteri yüzeyine net negatif yük verir ve ayrıca hastalık patogenezinde önemli rol oynar.

Lipopolisakkarit içindeki su dolu porin proteinleri, besinler ve antibiyotikler dahil diğer maddelerin dış membrandan geçişini kontrol eder.

Periplazmik boşluk sadece gram negatiflerde, dış membran ve iç membran arasında bulunur. Murein tabakasını da içeren bu alanda, dış membrandan geçen antibiyotikler dahil çevresel çözülmüş maddeleri detoksifiye eden birçok enzim bulunur (13).

Beta-laktamlar, beta-laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörleri olmak üzere 5 temel sınıfa ayrılırlar. Beta-laktam antibiyotikler gerek toplum, gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanların başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirdiği ve beta-laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı gözlenmektedir (11).

2.2.1. Penisilinler

Penisilinler, temel kimyasal yapıları; 5 üyeli bir tiazolidin halkası ve 4 üyeli bir beta-laktam halkasının oluşturduğu çekirdek (6-aminopenisilanik asit) ve yan zincirden meydana gelen doğal ve yarı-sentetik antibiyotiklerin oluşturduğu bir gruptur. Doğal penisilinler *Penicillium* mantarından elde edilirler (14, 15).

Doğal penisilinler: Benzilpenisilin (penisilin G), fenoksimetil penisilin (penisilin V)

Yarı-sentetik penisilinler:

- Penisilinaz dirençli: Metisilin, nafsilin, kloksasilin, flukloksasilin, dikloksasilin, oksasilin.

- Aminopenisilinler: Ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, pivampisilin.

- Karboksipenisilinler: Karbenisilin, tikarsilin.

- Üreidopenisilinler: Azlosilin, mezlosilin, piperasilin.

Penisilin/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları: Ampisilin/sulbaktam, tikarsilin/klavulanat, amoksisilin/klavulanat, piperasilin/tazobaktam.

Penisilinler gram pozitiflerin büyük çoğunluğuna, gram negatiflerin çoğunluğuna ve anaerob mikroorganizmalara etkilidir (15). Ancak geniş aktivite aralığına rağmen bakterilerin çoğu doğal penisilinlere intrinsik veya edinsel direnç gösterirler. Doğal penisilinler bazı gram pozitif bakterilerin (özellikle streptokoklar), bazı anaerob bakterilerin ve bazı spiroketlerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde hala kullanılmaktadırlar. *N. meningitidis* ve bazı *H. influenza* suşları da doğal penisilinlere duyarlıdır (16).

Penisilinazlara dirençli penisilinler, antistafilokokal penisilinler olarak da bilinirler (15). Yan zincirleri, stafilokok beta-laktamazının bağlanmasını önler. Ancak metisilin-rezistan *S. aureus* (MRSA) ve metisilin-rezistan *S. epidermidis*'in (MRSE) PBP'lerine bağlanamadıkları için bu suşlara etkisizdirler.

Aminopenisilinler; ampisilin ve amoksisilin, doğal penisilinlere benzer aktivite spektrumuna sahiptirler ve ayrıca yan zincirlerindeki ilave amino grubu hidrofilikliklerini arttırdığı için *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp. ve *Salmonella enterica* gibi bazı gram negatif enterik basillerin dış membranlarındaki porinlerden geçmelerine olanak sağlar ve bu bakterileri de spektruma dahil eder. Ancak beta-laktamaz kodlayan gen edinimine bağlı olarak, başlangıçta aminopenisilinlere duyarlı olan çoğu gram negatif bakteri artık dirençli hale gelmiştir.

Piperasilin ve tikarsilin geniş spektrumlu penisilinlerdir, yan zincirleri gram negatif bakterilere aminopenisilinlerden de daha iyi penetre olmalarını sağlar, ayrıca bazılarında duyarlı olmalarına rağmen beta-laktamazlara aminopenisilinlere göre daha dirençlidirler. Böylece aminopenisilinlerle karşılaştırıldıklarında bu geniş spektrumlu penisilinler çoğu *Pseudomonas aeruginosa* da dahil olmak üzere gram negatif basil-

lere karşı daha etkindirler (16). Karbenisilin, tikarsilin, azlosilin, mezlosilin, piperasilin antipsödomonal penisilinler olarak da bilinirler (17).

Beta-laktamaz inhibitörleri(sulbaktam, klavulanik asit, tazobaktam vb.) yapısal olarak penisilinlere benzerler, bu yüzden beta-laktamazları bağlarlar, bu bağlanma beta-laktamazın inaktivasyonu ile sonuçlanır. Beta-laktamlarla kombine olarak kullanılırlar (16).

2.2.2. Sefalosporinler

Sefalosporinlerin temel yapısı; 4 üyeli beta-laktam halkası ve 6 üyeli dihidrotiazin halkasından oluşan çekirdek (7-aminosefalosporanik asit) ve bu halkalara bağlı birer yan zincirdir.

Beta-laktam halkasına bağlı yan zincirdeki (R1) modifikasyonlar antibakteriyel aktiviteyi, dihidrotiazin halkasına bağlı yan zincirdeki (R2) değişiklikler ise farmakokinetiği etkiler. Sefalosporinlerin ilk üyelerinin kaynağı *Cephalosporium acremonium* mantarıydı (16).

Sefalosporinler antibakteriyel aktivitelerinin genel özelliklerine göre sınıflandırılırlar (15):

1. kuşak sefalosporinler (Dar spektrum): Sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefaleksim, sefapirin, sefradin, sefadroksil.

2. kuşak sefalosporinler (Genişletilmiş spektrum): Sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, seforanid, sefprozil, lorakarbef, sefaklor, sefmetazol, sefotetan.

3. kuşak sefalosporinler (Geniş spektrum): Sefdinir, sefditoren, sefiksim, sefotaksim, seftizoksim, sefoperazon, seftriakson, seftibuten, seftazidim, sefpodoksim.

4. kuşak sefalosporinler (Genişlemiş spektrum): Sefepim, sefpirom.

Birinci kuşak sefalosporinler gram pozitiflere iyi etkiliyken gram negatiflere nispeten daha az etkilidirler (15). Ancak MRSA ve MRSE'nin ve çoğu penisilin dirençli pnömokokun PBP'lerine bağlanamazlar, bu yüzden bu bakterilere karşı da etkisizdirler (16). Ayrıca enterokoklar da sefalosporinlere doğal dirençlidirler (18).

İkinci kuşak sefalosporinlerden sefoksitin ve sefotetana sefamisinler adı verilir, bunlar *Cephalosporium acremonium* mantarından değil, *Streptomyces*

lactamdurans bakterisinden elde edilen bileşiğin türevleridirler. Beta-laktam halkalarında hidrojen yerine metoksi grupları vardır. Bu yüzden gerçek sefalosporin değildirler, ancak kimyasal ve farmakolojik olarak benzer olduklarından bu grupta yer alırlar.

Gerçek ikinci kuşak sefalosporinler, gram pozitif bakterilere birinci kuşak sefalosporinler kadar etkilidir. İkinci kuşak sefalosporinlerin aerob fakültatif gram negatif bakterilere karşı aktiviteleri artmıştır (16). *H. influenza* ve *Neisseria* spp. ve çoğu anaerob bakteriye karşı da etkindirler (15). Sefamisinler, anaerob bakterilerin beta-laktamazına karşı artmış stabiliteye sahiptirler, ancak aerob gram pozitif bakterilere karşı etkileri nispeten kısıtlıdır (16). İkinci kuşak sefalosporinler *Pseudomonas* spp.'ye etkili değildirler (15). Bu kuşaktan lorakarbef, karbasefem olarak bilinen, kimyasal stabilitesi artırılmış bir beta-laktamdır (19).

Salmonella spp. ve *Shigella* spp. için birinci ve ikinci kuşak sefalosporinler ve sefamisinler *in vitro* olarak aktif görünebilir fakat klinik olarak aktif değildirler ve duyarlı olarak raporlanmamalıdır (20).

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin çoğunda bulunan, R1 yan zincirindeki aminotiazolil grubu, bu ajanlara bakteri dış membranından artmış penetrasyon, PBP'lere artmış afinite ve aerob fakültatif gram negatif bakterilerin plazmit kökenli beta-laktamazlarına karşı stabilite kazandırır. Bu nedenle bu ajanlar *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Neisseria* spp. ve *H. influenzae*'ye karşı ikinci kuşak sefalosporinlere göre daha etkilidirler (16). Ancak gram pozitif bakterilere karşı dar spektrumlu sefalosporinlere göre daha az etkilidirler (15). Ayrıca *Enterobacter* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii* ve *Citrobacter freundii* dahil çoğu *Enterobacteriaceae* üyesi başlangıçta üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlılık gösterir ancak bu bakteriler kromozomal kökenli indüklenebilir AmpC beta-laktamaz taşıdıklarında tedavi sırasında direnç ortaya çıkabilir (16). Üçüncü kuşak sefalosporinlerden seftazidim ve sefoperazon *Pseudomonas* spp.'ye karşı da etkilidir (21).

Dördüncü kuşak sefalosporinlerden sefepim, üçüncü kuşak sefalosporinlerin R1 yan zincirindeki aminotiazolil grubuna dokunulmadan, R2 yan zincirinde modifikasyonlar yapılması ile bulunmuştur. Böylece antistafilokokal etki kaybolmadan antipsödomonal aktivite gösterir ve çoğu *Enterobacteriaceae* suşuna karşı da artmış

aktiviteye sahiptir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin kromozomal kökenli indüklenabilir beta-laktamazlarına da dayanıklıdır (16). Ancak dördüncü kuşak sefalosporinler anaerob bakterilere klinik olarak etkisizdirler (15).

2.2.3. Monobaktamlar

Klinik kullanımda olan tek monobaktam aztreonamdır (15). Tek halkalı yapıya sahiptir. Aerob gram negatif bakterilerin PBP-3'üne bağlanarak etki gösterir. *Pseudomonas* spp., *Enterobacteriaceae* ailesi, *Neisseria* spp. ve *Haemophilus* spp.'ye karşı etkilidir. Aerob gram pozitif bakteriler ve anaerob bakterilerin PBP'lerine zayıf bağlandığından bu bakterilere inhibitör etkisi zayıftır (22).

Sefuroksim, sefepim, sefpirom, sefotaksim, seftazidim ve seftriakson gibi sefalosporinler ve aztreonam, oksimino-beta-laktamlar olarak da bilinirler. Sefalosporin çekirdeğinin 7. pozisyonu ve monobaktam çekirdeğinin 3. pozisyonundaki yan zincirlerde bulunan oksimino grupları TEM ve SHV tipi beta-laktamazlara karşı dayanıklılık sağlar (23,24,25).

2.2.4. Karbapenemler

Karbapenemler özellikle çoklu ilaç dirençli bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir beta-laktam antibiyotik sınıfıdır (26). Hastane pnömonisi, komplike karın içi enfeksiyon, septisemi, komplike cilt enfeksiyonu, komplike idrar yolu enfeksiyonu, menenjit ve kistik fibroz akut alevlenmeleri gibi çeşitli ciddi enfeksiyonların ampirik tedavisinde önerilirler (27). Karbapenemler yüzlerce farklı beta-laktam antibiyotik arasında en geniş spektruma sahip ve gram pozitif ve negatif bakterilere karşı en etkili antibiyotiklerdir. Bu nedenle ağır bir enfeksiyon ya da dirençli bakteri enfeksiyonu düşünüldüğünde kullanılan son seçenek ilaçlardır (28). Ancak şu an karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* de dünya çapında bildirilmektedir (6).

Keşfedilen ilk karbapenemler, *Streptomyces olivaceus*'ın ürettiği olivanik asitlerdi. Bunu 1976'da *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen tienamisin keşfi izledi. Bu bileşikler kimyasal olarak stabil olmadıklarından klinikte kullanılmadılar.

Yıllar sonra daha stabil bir tienamisin türevi olan ve imipenem (orijinal adıyla MK0787) olarak bilinen N-formimidoil tienamisin sentezlendi ve 1984'te kullanımı

onaylandı. Bu bileşik daha stabil olduğundan terapötik olarak faydalıydı. Ancak böbrek fırçamsı kenarının dehidropeptidaz-I (DHP-I) enzimine karşı stabil olmaması, idrar imipenem düzeylerinin azalmasına ve potansiyel nefrotoksik bir metabolitin oluşumuna yol açtı. İmipenem ile 1:1 oranında birlikte uygulanan ilave bir bileşik olan silastatinin geliştirilmesi DHP-I ile hidrolizi önledi ve nefrotoksisiteyi azalttı.

Meropenem 1- β -metil grubu ve 2-tiopirolidinil parçası bulunan ve böylece DHP-I'e karşı stabil hale gelen ilk karbapenemdi.

Daha sonra biapenem, panipenem, ertapenem, lenapenem, E-1010, S-4661 ve BMS-181139 gibi diğer parenteral uygulanan karbapenemler geliştirildi. Oral uygulanan karbapenemler ise sanfetrinem, DZ-2640, CS-834 ve GV-129606'dır (27).

Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması

Grup 1: Ertapenem, panipenem (non-fermentatif etkinlikleri sınırlı)

Grup 2: İmipenem, meropenem, biapenem, doripenem

Grup 3: CS-023

Birinci grup karbapenemler olan ertapenem ve panipenem özellikle toplum kökenli ciddi enfeksiyonların tedavisinde, ikinci grup karbapenemler ise güçlü non-fermentatif etkinlikleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Üçüncü grup karbapenem olan CS-023 ise ikinci grubun etkinliğine ek olarak MRSA'ya karşı da aktivite göstermektedir (4).

Karbapenemlerin Yapıları

Karbapenemler de penisilinler gibi 4 üyeli beta-laktam halkasının yanında 5 üyeli halkaya sahiptir ancak C-1 pozisyonunda sülfür yerine karbon bulunur. Bu karbon, karbapenemlerin *potens*'i, spektrumu ve beta-laktamazlara karşı dayanıklılığında önemli role sahiptir. Yan zincir olarak pirolidin bulunan karbapenemler (panipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem) daha geniş antimikrobiyal spektruma sahiptirler. Çoğu karbapenemde bulunan hidroksietilin R konfigürasyonu beta-laktamın etki gücünü artırır. Karbapenemlerin, C-5-C-6 bağında trans konfigürasyonları beta-laktamazlara dayanıklılık sağlar.

İmipenem ve panipenem böbrekte DHP-I ile inaktivasyona duyarlıdır. Bu nedenle bir inhibitörle; silastatin veya betamipron ile birlikte uygulanması zorunludur. 1- β grubuna metil grubu eklenmesi DHP-I hidrolize karşı koruyucudur (28).

Karbapenemlerin Etki Mekanizmaları

Karbapenemler gram negatif bakteriye porin olarak da bilinen dış membran proteinlerinden (OMP) girerler (29). Karbapenemler, sefalosporinlerden daha küçük moleküllerdir ve dipolardır. Bu iki özellik, gram negatif bakteri dış membranından hızlı geçiş sağlar (27). Periplazmik boşluğa geçtikten sonra bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan oluşumunu katalizleyen PBP enzimlerini kalıcı biçimde açile ederler. Karbapenemlerin etkinliğinde anahtar bir faktör, çok sayıda farklı PBP'ye bağlanabilme yetenekleridir. Bakterideki farklı PBP'lere (PBP-2, PBP-4, PBP-3 ve PBP-1b) yüksek affinite gösterirler (27,30). Hücre duvarı oluşumu, yapım ve otolizin aynı anda gerçekleştiği dinamik bir süreç olduğu için PBP'ler inhibe olduğu zaman otoliz devam eder. Sonuç olarak peptidoglikan zayıflar, hücre ozmotik basınca bağlı olarak patlar (28).

Karbapenemlerin Mikrobiyolojik Aktiviteleri

Karbapenemler var olan penisilin, sefalosporin ve beta-laktam-beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının tümünden daha geniş antimikrobiyal spektrum gösterirler (31). *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ve ertapenem hariç *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* ve *Acinetobacter* spp. gibi non-fermentatif gram negatif bakterilere karşı aktiftirler. Ayrıca streptokoklar, metisilin duyarlı stafilokoklar, *Neisseria* spp. ve *Haemophilus* spp.'ye karşı da aktivite gösterirler. Diğer geniş spektrumlu antibiyotiklerin çoğundan farklı olarak çoğu gram pozitif ve gram negatif anaerob bakteriye (*Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus*, *Clostridium perfringens*) karşı da aktiftirler. Karbapenem dirençli bakteriler; ampisilin dirençli *Enterococcus faecium*, metisilin dirençli stafilokoklar, *Stenotrophomonas maltophilia* ve bazı *Clostridium difficile* izolatlarıdır (27). Tablo 2.2'de karbapenem grupları ve aktivite spektrumları gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Karbapenem grupları ve aktivite spektrumları (27)

Karbapenem grubu	Grup 1	Grup 2	Grup 3
	Ertapenem	Imipenem Meropenem Doripenem	PZ-601
Gram-negatif aeroblar			
<i>Acinetobacter</i>	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
<i>Burkholderia cepacia</i>	Dirençli	Değişken	Dirençli
<i>Enterobacteriaceae</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Haemophilus</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Moraxella</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Neisseria</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dirençli	Duyarlı	Dirençli
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Dirençli	Dirençli	Dirençli
Gram-pozitif aeroblar			
<i>Enterococcus faecalis</i>	Dirençli	Değişken	Değişken
<i>Enterococcus faecium</i> (ampisilin-dirençli)	Dirençli	Dirençli	Dirençli
<i>Listeria</i>	Dirençli	Duyarlı	Raporlanmadı
<i>Staphylococcus aureus</i> (metisilin-duyarlı)	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>S. aureus</i> (metisilin-dirençli)	Dirençli	Dirençli	Duyarlı
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penisilin-duyarlı)	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (penisilin-dirençli)	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Viridans grup streptokoklar	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
Anaeroblar			
<i>Bacteroides</i>	Duyarlı	Duyarlı	Duyarlı
<i>Clostridium difficile</i>	Duyarlı	Duyarlı	Raporlanmadı
<i>Eubacterium</i>	Duyarlı	Duyarlı	Raporlanmadı
<i>Fusobacterium</i>	Duyarlı	Duyarlı	Raporlanmadı
<i>Peptostreptococcus</i>	Duyarlı	Duyarlı	Raporlanmadı
<i>Propionibacterium</i>	Raporlanmadı	Duyarlı	Raporlanmadı

Genel olarak imipenem, panipenem ve doripenem gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. Meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem gram negatif organizmalara karşı biraz daha etkilidir. Ertapenem, biraz daha kısıtlı bir spektruma sahiptir, *P. aeruginosa*'ya karşı imipenem veya meropenem kadar aktif değildir. Meropenem *A. baumannii*'ye karşı imipenem veya doripenem kadar etkili değildir (28).

Doripenem *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'ye karşı imipenem ve meropeneme göre daha düşük MİK değerlerine sahiptir (32). Ayrıca doripenem karbapenemazlar tarafından hidrolize en az duyarlı olan karbapenemdir, imipeneme göre hidrolizi 2-150 kat daha yavaştır (33). Meropenem, klavulanat ile kombine kul-

lanıldığı zaman normalde kromozomal beta-laktamazına bağlı olarak beta-laktamlara dirençli olan çoklu ilaç dirençli *M. tuberculosis*'i öldürebilir (34).

İmipenem

En yaşlı karbapenem olan imipenem, yeni karbapenemlere göre birçok dezavantaja sahip olmasına rağmen hala önemli ölçüde kullanılmaktadır. *US Food and Drug Administration* (FDA) tarafından menenjit için onaylanmaz, böbrek yetmezliği ve yapısal beyin hastalığı gibi yüksek riskli hastalarda nöbetlere sebep olma eğilimi nedeniyle santral sinir sistemi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktan kaçınılmalıdır. Tipik olarak *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp.'ye karşı çok aktiftir. Ancak tedavi sırasında imipeneme direnç gelişebilir. *P. aeruginosa*'da karbapenemlere spesifik OprD porini *down*-regülasyonu bu tip dirence yol açabilir. OprD kaybı diğer beta-laktamlara azalmış duyarlılık sağlamaz ancak tüm karbapenemleri etkiler. *P. aeruginosa*'ya benzer olarak, *Enterobacter* spp.'de de tedavisi sırasında imipenem direnci gelişebilir ancak daha az sıklıkla karşılaşılır ve porin kaybı ile kombine olarak artmış AmpC aktivitesini gerektirir. İmipenem gram pozitif bakterilere karşı diğer karbapenemlere göre biraz daha aktiftir.

Panipenem (RS-533)

Japonya'da 1993'de klinik kullanıma giren, ikinci onaylanan karbapenemdi. DHP-I ile hidrolize duyarlıdır, bu yüzden bu enzimi inhibe eden betamipron ile birlikte uygulanması gerekir. Japonya, Çin ve Güney Kore'de onaylanmıştır.

Meropenem

Meropenem imipeneme benzer bir aktivite spektrumuna sahiptir (*P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. dahil) ve gram negatif aerob bakterilere karşı biraz daha aktiftir. *P. aeruginosa*'da bulunan MexAB-OprM eflüks sisteminin substratıdır. Bu eflüks sisteminin aşırı ekspresyonu meropenem ve diğer substrat antibiyotiklerin MİK değerlerini yükseltir ancak imipenemi etkilemez. Ayrıca OprD porin *down*-regülasyonu da meropenem MİK değerini yükseltir ancak genellikle klinik sınır değerler ile tanımlanan direnç düzeyine ulaşmaz. Bu düzeydeki bir direnç için beta-

laktamaz ile OprD gibi bir dış membran proteini *down*-regülasyonu ve MexA-OprM gibi bir eflüks sisteminin kombinasyonu gerekir.

Meropenem 3 ay ve üstü çocuklarda ve erişkinlerde bakteriyel menenjit tedavisi için onaylanmıştır.

Ertapenem (MK-0826)

2001’de geliştirilen, imipeneme göre DHP-I ile inaktivasyona daha dirençli bu yüzden silastatin veya betamipron gibi bir DHP-I inhibitörü ilavesi gerektirmeyen bir 1- β -metil karbapenemdir. İmipenem ve meropeneme göre daha uzun eliminasyon yarı ömrüne sahiptir, bu nedenle günde tek dozluk uygulama için uygundur. Muhtemel sebebin aerob ve anaeroblardan oluşan karışık flora olduğu toplum kökenli komplike bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde önemli bir seçenektir. Bazı hastane enfeksiyonlarının tedavisi için de bir seçenektir, ancak *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. gibi non-fermentatif gram negatiflere karşı aktivitesi olmadığından bu patojenlerden şüphelenilen enfeksiyonlar için kullanılamaz. GSBL üreten patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlarda yaygın olarak etkili olmasına karşın, GSBL üreten bakterilere karşı diğer karbapenemlere göre *in vitro* olarak azalmış aktivite gösterir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde ertapenem direncinin en yaygın formu AmpC üretimi ve porin kaybı kombinasyonudur. Bu tip direnç, tedavi sırasında GSBL üreten bir *K. pneumoniae* suşunda da raporlanmıştır. Beyin-omurilik sıvısına geçebilmesine rağmen ertapenem bakteriyel menenjit tedavisi için uygun değildir.

Doripenem (S-4661)

Hastane kökenli pnömoni (ventilator ilişkili dahil), komplike karın içi enfeksiyon ve komplike idrar yolu enfeksiyonu tedavisinde kullanılmış bir parenteral 1- β -metil karbapenemdir. İnsan DHP-I’ine karşı stabildir ve geniş aktivite spektrumuna sahiptir. İmipenemin gram pozitif, meropenemin gram negatif patojenlere olan *in vitro* aktivitesini birleştirir. AmpC ve GSBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine karşı da aktivitesini korur. *P. aeruginosa* için doripenem MİK’leri diğer antipsödomonal ajanlara göre daha düşüktür ve karbapenem dirençli *P. aeruginosa* suşlarının büyük kısmını inhibe edebilir (27).

Ciddi enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler diğer antimikrobiyallerle kombine kullanılabilir. Çoklu ilaç dirençli patojenler, hastaların birden çok antibiyotikle tedavisini gerektirdiği için kombinasyon terapisi yoğun ilgi çekmektedir (35).

Karbapenemlerin Farmakolojisi ve Klinik Kullanımı

Klinik kullanımdaki tüm karbapenemlerin oral biyoyararlanımları düşüktür, gastrointestinal membranlardan kolayca geçemezler ve intravenöz uygulanmalıdırlar. İmipenem/silastatin ve ertapenem ayrıca intramüsküler uygulanabilir. Diğer beta-laktamlar gibi, tüm karbapenemler esas olarak renal ekskresyon ile elimine olurlar.

Karbapenemlerde Yan Etkiler ve Tolerans

Beta-laktamların sık reçete edilen antibiyotikler olmalarının nedeni diğer antibiyotiklere göre daha güvenli olmalarıdır. Karbapenemler genellikle iyi tolere edilir. Karbapenem tedavisinde en sık görülen yan etkiler ürtiker, raş, akut hipersensitivite gibi alerjik reaksiyonlardır. Diyare, psödomembranöz enterokolit, nörotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite, koagülasyon anormallikleri ve immün modülasyon, görülebilen diğer yan etkilerdir. Ayrıca karbapenem kullanımı bağırsak florasını değiştirebilir ve karbapenem dirençli izolatları baskın hale getirebilir (27,28).

2.3. Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları

Antibakteriyel ilaçların kullanımına bakteriler çeşitli direnç formları göstererek karşılık vermişlerdir. Antimikrobiyal kullanımı arttıkça bakteriyel patojenlerin gösterdiği direnç mekanizmalarının düzeyi ve karmaşıklığı da artmıştır (36).

Antibiyotik direnci; bir mikroorganizma türünün bazı suşlarının antibiyotikten etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir suşun çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale gelmesi olarak tanımlanır (37). Bakteriyel direnç, özellikle kritik yoğun bakım hastalarında hastanede yatış süresinin uzaması, morbidite ve mortalitede artış ile sonuçlanabilmektedir (38).

Amerikan Enfeksiyon Hastalıkları Derneği, hastane enfeksiyonlarının çoğundan sorumlu olan dirençli bakterileri, cinslerinin baş harflerinden oluşan ve antibiyotik etkilerinden kaçış anlamındaki “ESKAPE” kelimesi ile vurgulamıştır (39).

Enterococcus faecium,
Staphylococcus aureus,
Klebsiella pneumoniae,
Acinetobacter baumannii,
Pseudomonas aeruginosa,
Enterobacter species

Klinik önemi olan MRSA ve GSBL üreten *E. coli* gibi bakterilere toplum kökenli enfeksiyonlarda da sık rastlanmaya başlanmıştır (40,41).

Direnç gelişimi ekonomik açıdan bakıldığında hastane maliyetlerini de artırmaktadır (42).

Bakterilerin antibiyotiklere olan direnci ikiye ayrılır: Doğal direnç ve kazanılmış direnç. Doğal direnç bakterilerin kromozomal direncidir. Örneğin gram negatif bakteriler hücre yapılarından dolayı vankomisine doğal dirençlidirler. Benzer şekilde zorunlu anaerob bakteriler aminoglikozidlere, mikoplazma beta-laktam antibiyotiklere genetik olarak dirençlidir. Kazanılmış direnç ise antibiyotik yokluğunda görülmez, farklı mekanizmalar ile antibiyotik baskısı altında gelişmektedir (38).

2.3.1. Antibiyotik Direncinin Genetik Mekanizmaları

Nükleotidlerde mikroevolüsyoner değişimler olarak tanımlanan nokta mutasyonları meydana gelebilir. Bu mutasyonlar antimikrobiyal ajanın aktivitesini engelleyecek şekilde hedef bağlanma yerlerini değiştirebilir (43). Geniş spektrumlu TEM ve SHV tipi beta-laktamazlar, genlerindeki nokta mutasyonlar ile genişlemiş spektrumlu fenotipe dönüşürler (44).

Bakterilerde görülebilen diğer bir genetik değişiklik büyük bir deoksiribonükleik asit (DNA) segmentinin yeniden düzenlenmesidir. Bakteri kromozomunun veya plazmitinin bir lokalizasyonundan büyük bir DNA segmentinin bir diğer yere inversiyon, duplikasyon, insersiyon, delesyon veya transpozisyon ile taşınmasıyla yeniden düzenlenme gerçekleşebilir. Bu yeniden düzenlenme bakteri genomunun kalan kısmından bağımsız olarak hareket edebilen transpozonlar veya

insersiyon sekansları (IS) olarak bilinen spesifik genetik elementler aracılığı ile gerçekleşir (45).

Üçüncü genetik değişim mekanizması ise bakterinin yabancı DNA'yı plazmitler, bakteriyofajlar, çıplak DNA parçaları ya da diğer bakteriden transpoze genetik eleman olarak (örneğin vertikal geçiş) almasıdır. Dış ortamdan alınan yabancı DNA, mikroorganizmanın genetik değişimine ve antimikrobiyal ajan baskısı altında seçilmesine neden olmaktadır. Bu duruma örnek olarak plazmit aracılı karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*, vankomisin dirençli *S. aureus*, enterobakterlerde iletilebilen kinolon direnci gelişimi gösterilebilir (38).

2.3.2. Antibiyotik Direncinin Biyokimyasal Mekanizmaları

A) Enzimatik İnaktivasyon

Beta-laktamları hidrolize eden beta-laktamazlar, aminoglikozidleri modifiye eden enzimler, kloramfenikölü inaktive eden asetiltransferaz ve makrolidleri inaktive eden esterazlar bu mekanizma ile gelişen dirençten sorumludur (46-49).

Beta-laktamazlar

Klinik olarak önemli bakterilerde en önemli direnç mekanizması bir veya daha fazla beta-laktamaz üretimidir. İlk beta-laktamaz, penisilin tıbbi kullanıma girmenden önce *E. coli*'de tanımlandı (50). Penisilin çağında, plazmitte kodlanan penisilinaza bağlı olarak *S. aureus*'ta hızlıca direnç ortaya çıktı. Bu beta-laktamaz hızlıca çoğu klinik *S. aureus* izolatına ve diğer stafilokok türlerine yayıldı (44).

Beta-laktamazlar kromozomal ya da plazmit kontrolünde sentezlenirler. Plazmitler kromozom dışı genetik elemanlar olup direncin yayılmasında önemlidirler. Gram negatif bakterilerde direnç genleri plazmitler aracılığı ile konjugasyonla yayılmaktadır (38).

Gram pozitif bakterilerde beta-laktamazlar ekzoenzim olarak hücre dışına salgılanırken, gram negatif bakterilerde periplazmik boşlukta bulunurlar. Bu nedenle gram negatif bakterilerde az miktarda enzim bile antibiyotiklerin etkisiz hale getirilmesi için yeterli olmaktadır (51).

Günümüzde 850'nin üstünde beta-laktamaz tanımlanmıştır (52). Ambler, beta-laktamazları proteinlerin aminoasit sekanslarına göre moleküler olarak sınıflandırmıştır (53). Bush ise enzimlerin fonksiyonel karakteristiklerine göre sınıflandırmıştır (54). Tablo 2.3'te moleküler ve fonksiyonel sınıflama görülmektedir.

Tablo 2.3. Beta-laktamazların sınıflandırılması (54)

Bush-Jacoby grup	Moleküler sınıf	Substrat	Klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibisyon	Tanımlayıcı özellik	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	Benzilpenisiline göre sefalosporin hidrolizi daha güçlü; sefamisinleri hidrolize edebilirler	<i>E. coli</i> AmpC P99 ACT-1 CMY-2 FOX-1 MIR-1
1e	C	Sefalosporinler	-	Seftazidim ve sıklıkla diğer oksimino- β -laktamların da artmış hidrolizi	GC1 CMY-37
2a	A	Penisilinler	+	Sefalosporinlere göre benzilpenisilin hidrolizi daha güçlü	PC1
2b	A	Penisilinler, erken sefalosporinler	+	Sefalosporin ve benzilpenisilin hidrolizi benzer	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	+	Artmış oksimino- β -laktam hidrolizi	TEM-3 SHV-2 CTX-M-15 PER-1 VEB-1
2br	A	Penisilinler	-	Klavulanik asit, sülbaktam ve tazobaktama direnç	TEM-30 SHV-10
2ber	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	-	Klavulanik asit, sülbaktam ve tazobaktama direnç ile birlikte Artmış oksimino- β -laktam hidrolizi	TEM-50

Tablo 2.3. Beta-laktamazların sınıflandırılması (54) (Devam)

2c	A	Karbenisilin	+	Artmış karbenisilin hidrolizi	PSE-1 CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, sefepim	+	Artmış karbenisilin, sefepim ve sefpirom hidrolizi	RTG-4
2d	D	Kloksasilin	Değişken	Kloksasilin veya oksasilinin artmış hidrolizi	OXA-1 OXA-10
2de	D	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	Kloksasilin veya oksasilin ve oksimino- β -laktam hidrolizi	OXA-11 OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Değişken	Kloksasilin veya oksasilin ve karbapenem hidrolizi	OXA-23 OXA-48
2e	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	+	Sefalosporinleri hidrolize eder, aztreonam ile inhibe olmaz	CepA
2f	A	Karbapenemler	Değişken	Artmış karbapenem, sefamisin ve oksimino- β - laktam hidrolizi	KPC-2 IMI-1 SME-1
3a	B(B1)	Karbapenemler	-	Karbapenemler dahil geniş spektrumlu hidroliz fakat monobaktam hidrolizi yok	IMP-1 VIM-1 CcrA IND-1
	B(B3)	Karbapenemler	-	Karbapenemler dahil geniş spektrumlu hidroliz fakat monobaktam hidrolizi yok	L1 CAU-1 GOB-1 FEZ-1
3b	B(B2)	Karbapenemler	-	Tercihen karbapenem hidrolizi	CphA Sfh-1

Grup 1 Sefalosporinazlar

Çoğu *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi ve bazı diğer mikroorganizmaların kromozomlarında kodlanan moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır. Sefalosporinlere karşı benzilpenisiline göre daha aktiftirler, sefoksitin gibi sefamisinlere karşı da aktiftirler ve genellikle klavulanik asit ile inhibisyona dirençlidirler. Sınıf A sefalosporinazların aksine aztreonama afiniteleri yüksektir. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* dahil çoğu organizmada AmpC ekspresyonu düşüktür, fakat ampisilin, amoksisilin, imipenem, klavulanik asit gibi beta-laktamlara maruziyet ile indüklenebilir. *A. baumannii* ve *E. coli* dahil diğer organizmalarda ise indüksiyon sisteminin bir veya daha fazla komponenti eksiktir (54). Grup 1 enzimler büyük miktarlarda

üretildikleri zaman, özellikle beta-laktam girişinin azalmış olduğu bakterilerde karbapenem (özellikle de ertapenem) direnci sağlayabilirler (55).

CMY, ACT, DHA, FOX, MIR ve diğer ailelerdeki plazmit aracılı grup 1 enzimler 1989'dan beri bilinmektedir ancak şu an plazmit aracılı alt grup 2be GSBL'lerine göre daha seyrek görülürler (56).

Yeni alt grup 1e enzimleri, aminoasit değişiklikleri, insersiyonlar veya delesyonların bir sonucu olarak seftazidim ve diğer oksimino-beta-laktamlara daha büyük aktivite gösteren grup 1 varyantlarıdır. Bunlar, *E. cloacae*'deki GC1 ve plazmit aracılı CMY-10, CMY-19, CMY-37 vb. enzimlerdir ve genişlemiş spektrumlu AmpC beta-laktamazlar (ESAC) da denir (54).

AmpC Tayini

Yeterli AmpC beta-laktamaz üreten mikroorganizmalar duyarlılık profili analizine dayanan GSBL taramasında pozitif sonuç verirler fakat klavulanik asit ile duyarlılık artışını içeren doğrulama testinde negatif sonuç alınır. Ancak bu fenotip AmpC üreticileri için spesifik değildir. Sefamisinlere intrinsik dirençli olan laktoz fermente etmeyen gram negatif organizmalar hariç, oksimino-beta-laktamlarla birlikte sefoksitine direnç AmpC varlığının göstergesi olabilir, ancak karbapenemazlar, birkaç sınıf A beta-laktamaz ve *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de dış membran porinlerinin üretim düzeylerinin azalması da sefoksitin direncine sebep olabileceği için spesifik değildir.

Üç boyutlu yöntem hem AmpC, hem GSBL üretimini saptamak için tasarlanmıştır. AmpC tayini için kullanılan indirekt form, zemin olarak kullanılan *E. coli* ATCC 25922 gibi duyarlı bir suş ve sefoksitin veya başka ajan içeren diske 3 mm uzaklıktan, agardaki dairesel yarığa eklenen test organizması süspansiyonu ile uygulanır. Sefoksitin AmpC enzimi ile hidrolize edilirse inhibisyon zonunda bozulma olur ve test pozitifdir. İleri bir modifikasyonda membran geçirgenliğini arttırmak için trisaminometan-etilendiamintetraasetik asit (Tris-EDTA) içeren filtre kağıdı diskine uygulanan test mikroorganizması, *E. coli* ATCC 25922 zemininin üstüne, sefoksitin diskine bitişik olarak yerleştirilir.

AmpC tayini için diğer bir yöntem, sınıf A GSBL doğrulama testinde klavulanik asit kullanımına benzer şekilde AmpC beta-laktamaz inhibitörü kullanı-

mıdır. Test organizması zemininin üstüne, seftazidim ve sefotaksim içeren diskler arasına yerleştirilen 500 µg'lık kloksasilin diski ile yapılan çift disk testi 15 AmpC üreten suş üzerinde araştırılmış ve tümünde uyumlu bulunmuştur.

Boronik asitlerin AmpC inhibitörleri olduğu uzun zamandır bilinmektedir. Bir disk potansiyelizasyon testinde 300 µg 3-aminofenilboronik asit (APBA) eklenmiş seftazidim veya sefotaksim diskinin çevresindeki inhibisyon zonunda ≥ 5 mm'lik artışın, test edilen tüm AmpC çeşitlerini güvenilir şekilde saptadığı ancak KPC hariç karbapenemaz ve GSBL üreten suşlarda negatif olduğu bulunmuştur (56).

Grup 2 Serin Beta-laktamazlar

Moleküler sınıf A ve D'yi içerir, son 20 yılda artan GSBL identifikasyonuna bağlı olarak en geniş beta-laktamaz grubudur.

Alt grup 2a penisilinazlar, görece kısıtlı hidrolitik aktivite spektrumuna sahip küçük bir beta-laktamaz sınıfıdır ve gram pozitif bakterilerde (stafilokoklar ve bazen enterokoklar) baskın olan beta-laktamazlardır. Tercihen benzilpenisilin ve çoğu penisilin türevini hidrolize ederler ve sefalosporin, karbapenem ve monobaktam hidrolizleri zayıftır. Klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olurlar. Bazı stafilokokal penisilinazlar plazmitlerce kodlanmasına rağmen çoğu kromozomaldir.

Alt grup 2b beta-laktamazlar penisilinleri ve sefaloridin ve sefalotin gibi 1. kuşak sefalosporinleri kolayca hidrolize ederler, klavulanik asit ve tazobaktam ile güçlüce inhibe olurlar (54). 1970'ler ve 1980'lerin erken döneminde tanımlanan en yaygın plazmit aracılı beta-laktamazlar olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 bu gruptadır (57).

Alt grup 2be GSBL'leri içerir. Grup 2b'deki penisilin ve sefalosporin hidrolizine ilave olarak sefotaksim, seftazidim, aztreonam gibi oksimino-beta-laktamlardan bir veya daha fazlasını hidrolize ederler. Grup 2be'nin ilk ve en geniş alt grubu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'deki aminoasit değişikliklerinden türevlenir, değişiklikler spektrumlarını genişletir ancak karşılığında benzilpenisilin ve sefaloridin hidrolizleri azalır (54). TEM ve SHV GSBL'lerine, fonksiyonel olarak benzer ancak daha hızlı çoğalan, *Kluyvera* türlerindeki kromozomal beta-laktamazlarla ilişkili CTX-M dahil olmuştur. Adından anlaşılacağı üzere çoğu CTX-M enzimi, sefotaksimi seftazidime göre daha çabuk hidrolize eder. Çoğu, sefepimi de hidrolize eder (58,59).

BEL, BES, SFO, TLA, PER ve VEB enzim ailelerinin üyeleri daha seyrek rastlanan GSBL'lerdir (60). Alt grup 2be beta-laktamazlar karakteristik olarak klavulanik asit ile inhibe olurlar, klinik laboratuvarlarda tayinlerinde kullanılan bir özelliktir .

CLSI'ya göre, sonuçları raporlamadan önce rutin GSBL doğrulama testi yapılması artık zorunlu değildir. Pozitif bulunan suşlar için de penisilin, aztreonam, sefalosporin sonuçlarını duyarlıdan dirençliye değiştirmek artık zorunlu değildir. Yine de, epidemiyolojik veya enfeksiyon kontrol amaçlı GSBL doğrulama testi hala yararlı olabilir (20).

OXA beta-laktamazlar oksasilini (veya kloksasilini) hidrolize etme yeteneklerini belirtmek için OXA adını almışlardır. Son dönemde *Acinetobacter* spp. veya *P. aeruginosa* gibi non-fermentatif bakterilerde karbapenem duyarlılığının azalmasının sebebi olarak oldukça önemli bir alt grup (2df) tanımlanmıştır. *Acinetobacter* spp.'deki OXA enzimleri esas olarak kromozomlarda bulunurlar ve suşlar arası aktarım seyrekdir. Bu enzimler yapısal olarak eski OXA beta-laktamazlarına benzerler ancak karbapenem hidroliz aktivitesine sahiptirler. Diğer karbapenemazlara göre hidroliz oranları yavaş olabilir ancak porin mutasyonu veya eflüks pompası gibi ilave bir direnç mekanizması varlığında tam karbapenem direnci görülebilir (61). Bu alt gruptan *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde plazmit kaynaklı OXA-23 ve OXA-48 enzimleri tanımlanmıştır (62).

Alt grup 2f, moleküler sınıf A'dan serin karbapenemazları içerir. Bu enzimlerin özgün substratları karbapenemlerdir. Tazobaktam ile klavulanik asite göre daha güçlü inhibe olurlar. Seftazidim gibi genişlemiş spektrumlu beta-laktamlar SME ve IMI-1 enzimleri ile iyi hidrolize olmazlar ancak aztreonam GES-3 ve GES-4 hariç çoğu tarafından parçalanabilir. SME ailesi, IMI-1 ve NMC-1 beta-laktamazlar ile birlikte kromozomal alt grup 2f enzimlerinin temsilcileridirler. Daha endişe verici olan ise KPC ve bazı GES enzimlerini içeren plazmitçe kodlanan alt grup 2f beta-laktamazlardır. Özellikle KPC karbapenemazlar, son dönemde New York ve İsrail'de, hastanelerde çoklu ilaç dirençli gram negatif enfeksiyon salgınlarında rol oynamışlardır ve dünya çapında yayılmaktadırlar (54).

Grup 3 Metallo-beta-laktamazlar (MBL)

Yapısal ve fonksiyonel olarak eşsiz bir beta-laktamaz grubudurlar. Klinik izolatlarda genellikle ikinci veya üçüncü bir beta-laktamaz ile kombine olarak üretilirler. Aktif bölgelerinde çinko (Zn) iyonuna ihtiyaç duymalarıyla diğer beta-laktamlardan yapısal olarak ayrılırlar. Fonksiyonel olarak öncelikle karbapenemleri hidrolize etme yetenekleri ile ayırt edilirlerdi ancak bazı serin beta-laktamazlar da artık bu yeteneğe sahiptir. Serin beta-laktamazların aksine MBL'ler monobaktama düşük afinite veya hidroliz yeteneği gösterirler ayrıca klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibe olmazlar. EDTA, dipikolinik asit (DPA) veya 1,10-öfenantrolin gibi metal iyon şelatörleriyle inhibe olurlar (54).

MBL'ler aslen gram pozitiflerde (örneğin *Bacillus cereus* [63]) veya *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes* (64), *Chryseobacterium meningosepticum* (65), *Bacteroides fragilis* (66), *Aeromonas* spp. (61) veya *Stenotrophomonas maltophilia* (67) gibi gram negatiflerde kromozomal olarak tanımlanmışlardır. Sayıları yıllardır görece sabit kalmıştır. Ancak transfer edilebilir elementlerde görülmeye başladıklarında çok sayıda varyantları ortaya çıkmıştır.

Alt grup 3a, global olarak görülen, daha çok non-fermentatif bakterilerde ancak *Enterobacteriaceae*'de de karşılaşılan IMP ve VIM gibi plazmitçe kodlanan MBL enzim ailelerini içerir (54). İlk olarak non-fermentatif bakterilerde tanımlandılar ancak şu an *Enterobacter* spp., *E. coli*, *C. freundii*, *Klebsiella* spp., ve *S. marcescens* dahil çoğu *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine yayılmışlardır. Plazmit aracılı karbapenem direnci şu an Güney Avrupa, Japonya, Asya ve Brezilya gibi dünyanın çeşitli bölgelerinde önemli bir klinik sorun haline gelmiştir (61).

B) Geçirgenliğin Değişmesi

Bakterinin dış membranında bulunan ve antibiyotiklerin hücre içine girmesini sağlayan porin proteinlerinin yapılarının mutasyonlar sonucu değişmesi ya da kaybı sonucu antibiyotiğin periplazmik boşluğa geçiş oranı azalır ve MİK artar. Özellikle beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminden sorumludur (38).

Örneğin *P. aeruginosa*'da OprD olarak bilinen spesifik porinin kaybı, eş zamanlı AmpC beta-laktamaz üretimi ile birlikte karbapenemlere (özellikle de imipeneme) direnç sağlar (27).

C) Antibiyotik Hedefinde Değişiklik

Makrolidler, linkozamidler ve streptograminlere direnç gelişimi antibiyotiklerin hedefi olan ribozomal yapılarda metilasyon ile olmaktadır. Kısaca MLS direnci olarak adlandırılan bu direnç *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Bacteroides* spp., *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ve başka bakterilerde de saptanmıştır (68).

Enterokoklardaki glikopeptid direnci, bu antibiyotiklere düşük afinitesi olan peptidoglikan prekürsörlerinin üretiminin sonucudur (69).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direncinde en yaygın mekanizma beta-laktamaz üretimi iken, gram pozitiflerde PBP değişiklikleridir (70).

S. pneumoniae'nin yüksek düzeyde dirençli suşlarında iki veya üç düşük afiniteli PBP kodlayan mozaik genlerin ortaya çıkışından intrinsik dirençli komşu organizmalardan edinilen DNA ile doğal transformasyon ve rekombinasyon olayları sorumludur (71).

Stafilokoklardaki metisilin direncinde beta-laktamlara düşük afiniteli PBP2a rol oynar. PBP2a'yı kodlayan *mecA* geni, PBP2 genindeki nokta mutasyonlar ile ortaya çıkmıştır ve stafilokokal kromozomal kaset (SCC*mec*) denen ve stafilokok türleri arasında horizontal olarak transfer edilebilen bir mobil elementte bulunur (72,73).

Kinolon direnci ise DNA giraz geninde meydana gelen mutasyon sonucu gelişmektedir. Sülfonamidlere direnç gelişiminden sorumlu genler bakterinin folik asit sentezinde görev alan ve antibiyotiğin etki ettiği dihidropteroat sentetaz, trimetoprim direncinde ise dihidrofolat redüktaz enzimlerinin yapılarının değişmesine neden olmaktadır (38).

D) Etkin Eflüks (Atım Pompaları)

Antibiyotik direnç mekanizmalarından biri de, bir veya birden çok antibiyotik grubunu bakteri hücrelerinden dışarı atan pompalardır. Bu pompaların çoğu sitoplazmik zarında bulunmaktadır (70). Gram negatif bakterilerdeki tetrasiklin (74), bazı gram pozitif bakterilerde gelişen makrolid, linkozamid ve streptogramin B (75), stafilokoklarda gelişen kinolon direncinde (76) etkin atım pompaları rol oynar.

P. aeruginosa, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei* ve patojen olmayan *Pseudomonas putida* türlerinde çoklu ilaç eflüks pompaları tanımlanmıştır (77).

2.4. Karbapenem Direnci

Çoklu ilaç direnci hem toplum kökenli, hem de hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olabilen farklı bakteri türleri arasında kaygı verici oranlara ulaşmıştır. En önemlilerinden biri, gram negatif basillerde görülen genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara dirençtir. Tedavide genelde son seçenek olan karbapenemlere artan direnç şu an çok sayıda hastane ve toplum kökenli gram negatif basilde gözlenmektedir (6).

2.4.1. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Karbapenemlere yönelik direnç gelişimi, değişen derecede hidroliz kapasitesine sahip karbapenemaz üretimiyle sınırlı değildir. Bu antibiyotiklere karşı bazı mikroorganizmalar intrinsik direnç gösterebilir. Örneğin; karbapenemlerin MRSA'nın PBP-2a reseptörlerine zayıf bağlanması, bu bakterilerdeki intrinsik dirençten sorumludur. Bazı suşlarda, atım pompalarıyla oluşan dirence ya da membran geçirgenliğinde azalmaya, GSBL ya da AmpC enzimlerinin aşırı üretiminin eşlik etmesiyle de karbapenem direnci oluşabilir. Özellikle CTX-M tipi GSBL'lerin *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde yayılmasının karbapenem direnci gelişmesini kolaylaştırdığı bildirilmektedir (4,78)

Çoğu *Enterobacteriaceae* ailesi üyesinde AmpC ekspresyonu düşüktür, ancak beta-laktam maruziyetine yanıt olarak indüklenebilir. İndüksiyon mekanizması karmaşıktır. Murein sentezinin bir beta-laktam ajan tarafından bozulması N-asetilglukozamin-1,6-anhidro-N-asetilmuramik asit oligopeptidlerinin birikimine yol açar. N-asetilglukozamin parçası, 1,6-anhidro-N-asetilmuramik asit tri-, tetra-, ve pentapeptid üretimi için ayrılır. Bu oligopeptidler LysR transkripsiyon düzenleyici ailesinin bir üyesi olan *ampR*'ye bağlanmak için UDP-N-asetilmuramik asit oligopeptidleriyle yarışır. UDP-N-asetilmuramik asit oligopeptidlerinin bağlanamaması, *ampR*'de şekil değişikliğine neden olur, bu da AmpC transkripsiyonunu aktive eder. Ayrıca bakterinin sahip olduğu sitoplazmik N-asetil-muramil-L-alanin amidaz olan *ampD* enzimi 1,6-anhidro-N-asetilmuramik asit ve N-asetilglukozamin-

1,6-anhidro-N-asetilmuramik asit oligopeptid türevlerinden peptidleri ayırır, böylece konsantrasyonlarını düşürerek AmpC aşırı ekspresyonunu önler.

Klinik izolatlarda AmpC aşırı ekspresyonunun en sık sebebi *ampD* mutasyonudur. *ampR* mutasyonları da sebep olabilir ama daha seyrek görülür (56).

Karbapenemaz üretmeyen bakterilerdeki karbapenem direnci aktarılamamakta ancak karbapenemaz genlerinin çoğu aktarılabilir özelliktedir, bu yüzden karbapenemaz üreten izolatlar çok daha önemli bir halk sağlığı sorunudur. Karbapenemaz üreten bakterilerin yayılımı şu an gram negatif bakterilerin antibiyotik direncinde en önemli sorundur ve kesinlikle kontrol altına alınmalıdır (6).

Karbapenemazlar

Karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar, hemen hemen tüm beta-laktamları hidrolize edebilen en güçlü beta-laktamazlardır (6).

İlk karbapenemazlar gram pozitif basillerde tanımlandı. 1990'ların başına kadar tüm karbapenemazlar türe spesifik kromozomal kodlanan beta-laktamazlar olarak tanımlandılar (79). *Enterobacteriaceae* ailesinde tanımlanan ilk karbapenemaz ise 1993'te bir *E. cloacae* klinik izolatında bulunan kromozomal NmcA'dır (80). Daha sonra karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri plazmitçe kodlanan karbapenemaz genlerinin kazanılmasının sonucu olarak dünya genelinde raporlanmıştır.

Ayrıca nadiren, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde üretilen kromozomal sefalosporinaz da (Ambler C, AmpC) karbapenemlere karşı hafif aktivite gösterir ama bunun klinik önemi yoktur (6,79).

Çoğunlukla, diğer direnç belirleyicilerini de taşıyan konjugatif plazmitlerde lokalize olan karbapenemaz genleri yüksek aktarılabilirlik oranlarına sahip olduklarından, karbapenemaz üreticileri, uygun antibiyotik tedavisi ve ayrıca salgın gelişiminin de önlenmesi için hızlıca tanımlanmalıdır (81).

Enterobacteriaceae ailesinde klinik olarak en önemli karbapenemazlar, KPC tipi sınıf A enzimler ve başlıca VIM, IMP ve NDM tiplerinin görüldüğü çinko bağımlı sınıf B MBL'lerdir. Plazmitçe eksprese edilen OXA-48 tipi sınıf D karbapenemazlar çerçeveyi tamamlar.

Enterobacteriaceae'de karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazların sınıflandırılması Tablo 2.4'te gösterilmiştir.

Tablo 2.4. *Enterobacteriaceae*'de karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazların sınıflandırılması

Tip	Moleküler sınıf	Fonksiyonel grup	Varyantlar	Türler
KPC	A	2f	KPC-2 --13	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Raultella</i> spp.
VIM	B(B1)	3a	VIM-1,-2,-4,-5,-6 VIM-11,-12,-13,-19,-23 VIM-24,-25,-26,-27,-32	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Serratia liquefaciens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>C. freundii</i> , <i>Morganella morganii</i> , <i>Proteus stuartii</i> , <i>P. mirabilis</i>
IMP	B(B1)	3a	IMP -1,-3,-4,-6,-8 IMP-11,-24,-27	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., <i>P. mirabilis</i> , <i>Proteus stuartii</i> , <i>Shigella flexneri</i> , <i>M. morganii</i>
NDM	B(B1)	3a	NDM-1,-4,-5,-6	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>K. oxytoca</i> , <i>C. freundii</i> , <i>M. morganii</i> , <i>Providencia</i> spp.
OXA	D	2df	OXA-48,-163,-181	<i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>C. freundii</i> , <i>P. mirabilis</i>

A) KPC Karbapenemazlar

KPC beta-laktamazları (KPC-2-KPC-13, moleküler sınıf A) penisilinler, eski ve yeni sefalosporinler, aztreonam ve karbapenemler dahil geniş bir beta-laktam spektrumuna karşı etki gösterir.

K. pneumoniae'de bugüne kadar tespit edilen *blaKPC* genlerinin tümü plazmitlerle taşınır. Genetik çalışmalar farklı genetik birimler arasında KPC kodlayan sekansların yayılımına olanak veren bir replikatif transpozisyon mekanizmasının (Tn3-benzeri transpozonlarda tipik) işlediğini gösterir ve bu durum, FII (muhtemelen *K. pneumoniae*'nin karakteristik FII virülans plazmidinin türevleri), L/M ve N gibi farklı Inc gruplarına ait farklı KPC kodlayan plazmitlerin ortaya çıkması ile sonuçlanmıştır. Aynı genetik yapılar, diğer *Enterobacteriaceae* türlerinin KPC pozitif izolatlarında da tanımlanmıştır.

Kendi substrat spektrumları doğrultusunda, KPC enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine, tüm beta-laktamlara karşı azalmış duyarlılık

veya direnç kazandırır. Dahası, beta-laktam direnç düzeylerini daha da arttıran dış membran geçirgenliğinde azalma gösteren KPC pozitif *K. pneumoniae* suşlarının ortaya çıktığını bildiren raporlar vardır.

Karbapenem MİK değerleri değişkenlik göstermesine rağmen, son CLSI ve *European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) sınır değerleri (*breakpoint*) çoğu KPC üreten izolatu bu ilaçlara dirençli olarak sınıflandırır. Ayrıca *Enterobacter* spp. gibi kromozomal kodlanan AmpC'nin dereprese üretiminin olduğu türlerde, karbapenem ve oksimino-beta-laktam MİK'leri *K. pneumoniae*'ye göre genelde daha yüksektir (82,83).

B) MBL'ler

MBL'ler belirgin aminoasit sekans farklılıklarına rağmen üç farklı fonksiyonel özellik paylaşan bir enzim sınıfı (moleküler sınıf B) oluştururlar. Bu özellikler; karbapenemleri hidrolize etme yeteneği, beta-laktamaz inhibitörlerine direnç ve EDTA, DPA gibi şelatör ajanlara duyarlılıktır (6,83).

Filogenetik analize göre, üç farklı kuşak MBL vardır: B1, B2, B3 (84).

Kromozomal kodlanan MBL'lere ek olarak B1 alt grubu kökeni hala bilinmeyen kazanılmış VIM, IMP, GIM, SPM, SIM, AIM, DIM ve NDM tipi enzimleri içerir (85). Bunlardan VIM, IMP ve NDM tiplerinin varyantlarıyla *K. pneumoniae* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de karşılaşılmıştır.

Bu beta-laktamazlar, aynı tip enzimler arasında bile hidrolitik verim önemli düzeyde farklı olmasına rağmen, penisilinler, eski ve yeni sefalosporinler ve karbapenemlere karşı aktiftirler. Ayrıca aztreonamı inaktive edemezler. Bu esas olarak B1 MBL'lerin monobaktamlara çok düşük bir afinite ile bağlanmasına bağlıdır (86).

K. pneumoniae'de şimdiye dek tanımlanan *blaVIM* ve *blaIMP* varyantları genelde sınıf 1 integronların değişken bölgeleri ile bileşik gen kasetleri olarak görülürler (87). Bunun aksine *blaNDM* genleri integronlarla ilişkili değildir (85).

MBL kodlayan *K. pneumoniae* plazmitlerinin geniş çapta dağılımı, mobilizasyon mekanizmalarının işlediği anlamına gelir. Farklı plazmitlerde MBL genlerinin bu yayılımı transpozisyon ve/veya rekombinasyon olayları sayesinde MBL geni içeren yapıların mobilizasyonu ile ilgili olabilir. IS26, ISEc33, ISSen4 ve

ISAbal25 gibi IS'ler tek başlarına veya transpozon parçaları (örneğin Tn3 ve Tn1696) halinde MBL kodlayan bölgelerde sıklıkla bulunur (83).

K. pneumoniae'de görülen üç MBL tipi ayrıca diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de görülmüştür: *E. coli*'de VIM, IMP, NDM, *Enterobacter cloacae*'de VIM ve IMP, *Serratia marcescens*'te IMP ve *Proteus mirabilis*'te VIM (85,88). Bu türlerde MBL genlerinin çoğu, *K. pneumoniae*'de bulunanlara benzemektedir.

MBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde beklenen temel fenotip; amino-, karboksi-, ve üreidopenisilinlere, penisilin-klavulanat kombinasyonlarına ve sefoksitine direnç, piperasilin-tazobaktam ve oksiminosefalosporinlere azalmış duyarlılık ve epidemiyolojik *cut-off* (ECOFF) değerleri ile karşılaştırıldığında artmış karbapenem MİK'leridir. Ancak gerçekte, MBL üreticileri sıklıkla dış membran geçirgenliğinde azalma gibi karbapenem direnç düzeylerini arttıran ilave mekanizmalara sahip olduklarından böyle minimal bir direnç profili en azından klinik izolatlar arasında nadiren görülmektedir. Aynı tür ve hatta aynı soya sahip MBL üreticileri arasındaki geniş karbapenem MİK aralığının da gösterdiği gibi, bu son mekanizma karbapenem direnç düzeylerini belirlemede önemli rol oynamaktadır (88-90). Ayrıca sıklıkla VIM üreticileri arasında karşılaşılan, SHV'ler gibi GSBL'ler, aztreonam direncini katacak şekilde direnç fenotipini genişletirler (91).

C) OXA-48

OXA-23, OXA-24/40 ve OXA-58 gibi sıklıkla *Acinetobacter spp.*'de karşılaşılan OXA tipi beta-laktamazlar (moleküler sınıf D) görece zayıf karbapenemaz aktivitesi sergilerler. 2001'de belirgin karbapenemaz aktivitesine sahip farklı bir OXA enzimi olan OXA-48, *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır. İmipeneme karşı hidrolitik verimi diğer *Acinetobacter spp.*'de görülen OXA'lara göre yaklaşık 10 kat daha yüksektir (92,93). Moleküler çalışmalara göre OXA-48'in karbapenem hidroliz süreci diğer OXA'larda görülenden farklıdır (94), ancak sonuç olarak OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatları kategorik olarak duyarlı olmalarına rağmen karbapenemlere artmış MİK gösterirler. OXA-48 ayrıca penisilinleri ve erken sefalosporinleri hidrolize eder ancak oksiminosefalosporinlere karşı aktivitesi zayıftır. Seftazidime duyarlıdır, sefotaksiyi çok düşük düzeyde inhibe ederler, klavulanat ve tazobaktamla inhibisyona dirençlidirler. Ancak OXA-48 ile birlikte GSBL de üretilebildiğinden

suşlar seftazidim ya da sefotaksime dirençli olabilir. Teorik olarak, GSBL üretimi olmayan OXA-48 pozitif suşların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde seftazidim gibi geniş spektrmlü sefalosporinler kullanılabilir. Yine de bu konuyla ilgili yeterince klinik tecrübe yoktur. Bir çalışmada ise GSBL negatif bir OXA-48 üretici *K. pneumoniae* enfeksiyonunun tedavisinde sefotaksim ve amikasin kombinasyonu başarılı bulunmuştur.

Temosilin (MiK>64 mg/L) ve piperasilin-tazobaktamın her ikisine birden yüksek düzeyde direnç gösteren ve en az bir karbapeneme azalmış duyarlılık veya direnç, olası OXA-48 tayaninde ilk adım olabilir (6,93,95).

K. pneumoniae'de ayrıca OXA-48'in diğer karbapenem hidrolize eden varyantları; OXA-163 ve OXA-181 ortaya çıkmıştır (96,97). *blaOXA-48* daima, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *Citrobacter freundii* gibi *Enterobacteriaceae* türleri arasında yayılımdan sorumlu olan aktarılabılır plazmitlerle taşınır (93,98).

Üstelik plazmit kökenli *blaOXA-48* içeren sekanslar, beta-laktam direnç genlerinin mobilizasyon ve ekspresyonu ile ilgili IS4 ailesinden IS1999 elementi ile ilişkilidir. Bu ilişki *blaOXA-48*'in diğer genetik birimlere transfer edilmesine olanak sağlar (99).

2.4.2. Karbapenemaz Üreticilerinin Epidemiyolojisi

A) KPC Üreticileri

KPC üreten *Enterobacteriaceae* ilk olarak 2001'de Kuzey Carolina'da bir klinik örnekte bildirildi (100).

Hızlı ve geniş çapta yayılımı ise ilk olarak 2000'li yıllarda ABD'nin kuzeydoğu kesimlerinde fark edildi. Sürveyans çalışmalarına göre bu epideminin merkez üssü New York'tu. Daha sonra KPC-2 ve KPC-3 (KPC-2 nokta mutasyonu) üreten izolatlar, muhtemelen kolonize hasta transferine bağlı olarak komşu eyalet hastanelerine yerleşti. Aynı periyotta KPC üreten *K. pneumoniae*, Latin Amerika ve İsrail'de de ortaya çıktı. Bunu kısa sürede Çin ve Yunanistan gibi diğer ülkeler takip etti. Yunanistan'da KPC pozitif *K. pneumoniae*, yaklaşık 2 yılda epidemik oranlara ulaşarak üçüncü basamak hastanelerde baskın hale geldi. Kuzey ve Batı Avrupa ülkelerinde KPC prevalansı düşüktür. Bu ülkelerde (İsviçre, İrlanda, Birleşik Krallık, Fransa, İsveç, Norveç, Hollanda ve Danimarka) çoğu bildirim, yüksek prevalanslı bölge kö-

kenli hastalarda üretilen sporadik izolatlar aittir. Ancak Fransa'da birden çok hastaneyi kapsayan bir salgın ortaya çıkmıştır. KPC üreticilerinin farklı bölgelerde yerleşik görüldüğü İtalya ve Polonya'da daha yüksek prevalanslar rapor edilmiştir. KPC üreten *K. pneumoniae*'nin hızlı global yayılımı çoklu aktarım yolları olduğunu düşündürmektedir. Genişçe kabul gören bir senaryoya göre, KPC pozitif *K. pneumoniae* ABD'den İsrail'e getirildi ve bunu takiben komşu ülkelere ve Yunanistan yolu ile Avrupa'ya yayıldı. Ancak bu senaryoyu onaylamak için indeks vakalar kesin olarak tanımlanmamıştır. KPC enzimleri çok sayıda farklı *K. pneumoniae* sekans tipinde (ST) saptandı. Ancak tüm dünyada bu enzimlere sahip izolatların büyük çoğunluğu ST258'e aittir. KPC üreten ST258 *K. pneumoniae*, çoklu ilaç dirençli hastane patojenlerinin en başarılılarından biri olarak sayılabilir. Beklendiği üzere, *E. coli* ve *E. cloacae* dahil, farklı diğer *Enterobacteriaceae* türlerinin KPC üreten izolatları, KPC pozitif *K. pneumoniae* prevalansının yüksek olduğu yerlerden raporlanmıştır. ABD, İsrail ve Yunanistan dahil farklı ülkelerde, sağlık birimlerinde KPC üreten *E. coli* salgınları meydana gelmiştir. Ayrıca diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde de geniş çeşitlilikte KPC pozitif sporadik izolatlar tanımlanmıştır (83,88).

B) MBL Üreticileri

Üç MBL ailesine (VIM, IMP ve NDM) ait enzim içeren *K. pneumoniae* suşları belirgin lokal farklılıklar olsa da uluslararası yayılıma zaten ulaşmıştır. VIM pozitif *K. pneumoniae* ilk olarak 2001-2003'te Güney Avrupa'da gözlenmiş, daha sonra çoğunlukla yüksek prevalanslı bölgelerden kolonize hasta transferleri aracılığıyla Kuzey Avrupa (örneğin Fransa, Almanya ve İskandinav ülkeleri) ve ABD'ye taşınmıştır (85). Tek tek hastanelerde kısıtlı bazı enfeksiyon kümeleri bildirilse de, Kuzey Avrupa ve ABD'de VIM pozitif *K. pneumoniae* izolasyon oranları düşüktür. Ayrıca Tunus, Güney Kore ve Venezuela'da sporadik olgular kaydedilmiştir. Son döneme kadar VIM üreten *K. pneumoniae* ve diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri Akdeniz ülkelerinde sıkça izole edilmiştir, ancak sadece Yunanistan'da epidemik oranlara ulaşmıştır. Ancak bu ülkeden elde edilen bugünkü sürveyans bilgisine göre bu mikroorganizmalar 2009'dan beri azalma eğilimindedir.

K. pneumoniae'nin IMP MBL edinimi, 1990'larda primer olarak Japonya'da ve bunun yanı sıra Tayvan ve Singapur'da tarif edildi. IMP pozitif *K. pneumoniae*

linik izolatları Japonya’da sık görülmeye devam etmektedir. IMP-4 üreten *K. pneumoniae* suşları ayrıca Çin ve Avustralya’da hastane salgınlarına sebep olmuştur. Ayrıca *S. marcescens* ve *E. cloacae* gibi IMP pozitif klinik *Enterobacteriaceae* izolatları aynı bölgeden (örneğin Japonya, Güney Kore ve Tayvan) bildirilmiştir. Dünyanın geri kalanında, IMP üreten *Enterobacteriaceae* suşları yayılımı, Türkiye, Lübnan, Brezilya ve ABD’de tanımlanan tek tek olgularla kısıtlı görünmektedir (79,83).

Farklı ülkelerin sürveyans sistemindeki farklılıklar ve kısıtlamalar, IMP veya VIM pozitif *K. pneumoniae* hakkında uluslararası epidemiyolojik bilginin güvenilirliğini etkiler. Ancak son tanımlanan MBL olan NDM’nin esas olarak *E.coli* ve *K. pneumoniae*’de olmak üzere *Enterobacteriaceae* izolatlarında aktarım yollarının ve halk sağlığına etkisinin aydınlatılmasında gösterilen uluslararası iş birliği, NDM üreticilerinin epidemiyolojisi hakkında zengin bir bilgi elde edilmesini sağladı. Epideminin merkezi, sağlık birimlerinde bu mikroorganizmaların yüksek sıklıkta izole edildiği ve farklı çevresel ortamlarda da geniş yayılım gösterdiği Hindistan’dı. Ayrıca *blaNDM* genleri *K. pneumoniae* ve *E. coli*’den başka *Enterobacteriaceae* türlerine de yayıldı (101,102). Ayrıca görünüşe göre Balkanların merkezinde ikinci bir “NDM üreten *K. pneumoniae*” kaynağı vardır, fakat Hindistan epidemisi ile bağlantısı kesin değildir (103). Buna karşılık NDM üreticilerinin Batı Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya ve Uzak Doğu’daki son dönemdeki yayılımı Hindistan, Pakistan ve Bangladeş kökenli hastalara dayandırılır. Bunun yanında hızlı yayılım, NDM üreten *K. pneumoniae* izolatlarının şimdiye dek bir karakteristiği olmuştur. Gerçekten de Hindistan epidemisi ile açık ilişkisi bulunmayan kolonize ve enfekte kişiler, birden çok ülkede giderek artan sıklıkta rapor edilmektedir (83).

C) OXA-48 Üreticileri

OXA-48 üreten *K. pneumoniae* ilk defa 2001’de, Türkiye’de, sporadik olarak saptanmıştır (62). Bunu, yakın zamanda diğer büyük şehirlerdeki hastane salgınları takip etti (104). Hemen hemen aynı zamanda, OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatları hem diğer Orta Doğu ülkeleri ve Kuzey Afrika ülkelerinde, hem de Birleşik Krallık, Fransa, Almanya, Belçika, Hollanda gibi Batı Avrupa ülkelerinde tanımlandı. Son ülkelerde OXA-48 üreticilerinin ortaya çıkışı esas olarak Kuzey Afrika’dan

gelen kolonize hastalara atfedildi (97,105). Son dönemde bir Hollanda hastanesinde OXA-48 üreten bir *K. pneumoniae* suşuna bağlı önemli bir salgın rapor edildi. Ancak, bu mikroorganizmaların Avrupa'da anlamlı yayılımına dair bir işaret yoktur. Orta Doğu ve Kuzey Afrika enfeksiyonun ana odağı olarak kalmasına rağmen, Hindistan, Senegal ve Arjantin'de OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolasyonları, global kabul edilebilecek bir genişlemeye işaret etmektedir (83). Ayrıca son dönemde *K. pneumoniae*'den başka türlere ait OXA-48 üreticilerinin izolasyonu, *blaOXA-48*'in yayılma potansiyelinin altını çizmektedir (98).

2.4.3. Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* İdentifikasyonu

Enterik basillerin karbapenemaz üretmeleri karbapenemlere mutlaka belirgin direnç kazanmaları anlamına gelmez. Günümüzde CLSI ve EUCAST tarafından yeni ve daha düşük sınır değerlerin sunulmasından sonra laboratuvarlar karbapenemaz üretimine bakılmaksızın karbapenem MiK'lerini raporlamaktadırlar. Ayrıca kayda değer karbapenemaz aktivitesine sahip enzimleri olmayan çeşitli *Enterobacteriaceae* izolatları da karbapenemler için artmış MiK değerleri gösterebilir. Yine de sağlık birimlerinde uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için karbapenemaz üreten mikroorganizmaların basit ve güvenilir karbapenemaz saptayan test uygulamaları ile izlenmesi faydalıdır. EUCAST'e göre *Enterobacteriaceae* için EUCAST karbapenem sınır değerleri, karbapenemaz üreticilerinin çoğu dahil, klinik önemi olan tüm direnç mekanizmalarını saptar. Karbapenemaz üreten bazı izolatlar bu sınır değerlerle duyarlı olarak kategorize edilir ve test edildiği gibi de raporlanmalıdır. Çoğu alanda, karbapenemaz tayini enfeksiyon kontrol amaçları için yapılır (106).

Ancak karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatları sıklıkla klinik karbapenem sınır değerlerinden daha düşük MiK değerlerine sahip oldukları için EUCAST, karbapenemaz tayini yapılacak suşların belirlenmesi için tarama *cut-off* değerleri yayınlamıştır. Bu değerlere göre ertapenem ve meropenem için MiK değeri $>0,125$ mg/L, zon çapı <25 mm, imipenem için de MiK değeri >1 mg/L, zon çapı <23 mm olan izolatlar karbapenemaz tayini yapılması için uygundur (78).

CLSI, karbaenemaz üretiminin fenotipik tayini için MHT önermektedir, ancak yine CLSI'ya göre MHT'nin epidemiyolojik veya enfeksiyon kontrol amaçları dışında uygulanmasına gerek yoktur ve MHT (+) izolatlarda karbapenem duyarlılık

test sonuçlarının yorumlarında değişiklik yapılmasına gerek yoktur. Karbapenemaz üreten mikroorganizmalar genellikle, 1 veya daha fazla karbapenem orta derece duyarlılık veya direnç ve 1 veya daha fazla 3. kuşak sefalosporine (sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, seftriakson) direnç gösterirler. Bu nedenle enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik araştırmalar için MHT testi, bu özelliklere sahip izolatlarla sınırlandırılabilir (20).

Tarama kriteri belirli bir ekolojik yerdeki epidemiyolojik duruma dayanarak adapte edilebilir. Karbapenemaz üreticilerinin önceden saptandığı yerlerde, CLSI kriterlerini uygulamanın yeterli olacağı beklenir. Diğer taraftan, düşük prevalanslı yerlerde bazen daha gevşek kriterlerin benimsenmesi (örneğin daha düşük *cut-off* değerlerinin kullanılması) KÜE ortaya çıkışının zamanında saptanmasını kolaylaştırır ve böylece daha fazla yayılmasını önleyici önlemlerin hızlıca alınmasına imkan verir. EUCAST bu amaçla vahşi popülasyondaki karbapenemlere duyarlı olan *Enterobacteriaceae* suşlarından herhangi bir karbapenem için sahip olunan en yüksek MiK değerini ECOFF değeri olarak yayınlamıştır (78).

Ayrıca *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve *Morganella morganii* için imipenem MiK değerleri, meropenem ve doripenem MiK değerlerine göre daha yüksek olmak eğilimindedir. Bu izolatlar, karbapenemaz üretiminden başka mekanizmalarla artmış MiK değerlerine sahip olabilirler.

Ertapenem direnci karbapenemaz üretiminin en duyarlı göstergesidir. Ancak bu ilacın kullanımının özgülük problemlerine sebep olabileceğine dikkat edilmelidir: “CTX-M üretimi veya aşırı AmpC beta-laktamaz üretimi” ile kombine azalmış geçirgenlik ertapenem MiK’ini anlamlı olarak etkileyebilir ve bu nedenle saptama özgülüğünü düşürebilir (20,78).

Meropenem, karbapenemaz üretimi tayininde duyarlılık ve özgülük dengesini en iyi sağlayan karbapenemdir .

Modifiye Hodge Testi

Yonca yaprağı veya modifiye Hodge testi (MHT), karbapenemaz üreten bir suş tarafından *in vivo* karbapenemaz üretimine dayanır ve karbapenemaz aktivitesinin saptanması için fenotipik yöntem olarak yaygınca kullanılmaktadır, CLSI tarafından da önerilen tek karbapenemaz tayin yöntemidir (6,20). CLSI tarafından

Enterobacteriaceae izolatlarında KPC tip karbapenemaz tayininde hem duyarlılık, hem özgülüğünün %90'dan yüksek olduğu belirtilmiştir. Düşük düzey MBL üretimini saptamada duyarlılık ve özgülüğü ise bilinmemektedir. Ayrıca MHT sonucu ne olursa olsun, karbapenem zon çapı veya MİK yorumlarında değişiklik yapılmamalıdır (20). Yöntemin çeşitli eksiklikleri vardır. EUCAST tarafından duyarlılık ve özgülüğü düşük olduğu ve yorumlanması güç olduğu için artık önerilmemektedir (78). Yöntem, sahip olunan karbapenemazın tipini ayırt edemez. En önemlisi CTX-M tipi GSBL veya artmış miktarlarda AmpC beta-laktamaz (sefalosporinaz) üreten izolatlarda yanlış pozitif sonuçlar gözlenmiştir. Ayrıca zayıf karbapenemaz aktivitesi gösteren MBL üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında duyarlılık problemleri (yanlış negatif sonuçlar) oluşabilir. Ayrıca kısıtlı sayıda izolatta gözlenmesine rağmen, NDM-1 üreten *K. pneumoniae* karbapenemaz tayininde MHT muhtemelen güvenilir değildir (6,78,83). MBL veya OXA karbapenemaz üreten izolatların tayininde MHT'nin duyarlılığını arttırmak için Mueller-Hinton (MH) agar yerine MacConkey agar kullanılması önerilmiştir. Performanstaki artış MacConkey besiyerinin içerdiği safra tuzları sebebiyle periplazmik enzimlerin artmış salınımına bağlanmıştır. Ancak bu değişiklik sistematik olarak değerlendirilmemiştir (107). Sonuç olarak kullanışlı bir yöntem olmasına rağmen MHT klinik laboratuvarlarda KÜE tayini için tek yöntem olarak kullanılamaz (78).

Şelatör Ajanlara Dayalı MBL Tayini

Klinik laboratuvarlarda MBL üreticilerinin fenotipik tayini, esas olarak MBL'lerin EDTA ile spesifik inhibisyonuna dayanır (108). Ayrıca, 2-merkaptopropionik ve merkaptoasetik asit gibi tiyol bileşiklerinin yanı sıra DPA ve 1,10-fenantrolin gibi diğer şelatör ajanların kullanıldığı çeşitli teknikler geliştirilmiştir (88). Şelatör kombinasyonu (örneğin EDTA ile birlikte 2-merkaptopropionik asit) kullanımı da önerilmiştir (109). Bu bileşikler MBL'yi çinko (Zn) divalen katyonundan mahrum bırakarak onu beta-laktamlara karşı etkisiz hale getirir. En yaygın MBL tayin testinde hidrolize edilebilir bir beta-laktam diski (seftazidim de yaygın olarak kullanıma karşın tipik olarak bir karbapenem) belli bir miktar MBL inhibitörü (en yaygın EDTA) içeren bir diske yakın yerleştirilir ve bu yüzden çift disk sinerji testi adını alır. Sinerji paterni oluşması, MBL üretimini gösterir. Bu yöntemin deza-

vantajı, yorumlamanın subjektif olması ve kantitatif olmamasıdır. Alternatif olarak beta-laktam diski, bir inhibitör ile potansiyelize edilir ve inhibisyon zonunun çapı sadece beta-laktam içereninkiyle karşılaştırılır ve bu yüzden kombine disk testi adını alır. İnhibisyon zonu çapında, önceden belirlenmiş bir *cut-off* değerinin üstündeki artış MBL aktivitesini gösterir. İmipenem ve EDTA içeren striplerin kullanıldığı çeşitli gradyent difüzyon metodları da (örneğin Ettest MBL [AB BIODISK, Solna, İsveç]) aynı prensibe dayanır. Genel olarak beta-laktam-şelatör kombinasyonuna dayanan MBL tayin yöntemleri *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de iyi performans gösterir, diğer *Enterobacteriaceae* türleri için sistematik olarak test edilmemişlerdir. Ayrıca kullanıcı, şelatör ajanların bakteri üremesi üstüne potansiyel zararlı etkilerini de daima hesaba katmalıdır. Ayrıca düşük karbapenem MİK'i gösteren MBL üreticilerinde yorumlama güçlükleri olabilir (83).

Boronatlara Dayalı KPC Tayini

KPC üretiminin fenotipik tayini, KPC'lerin boronik asit ve türevlerine, örneğin fenilboronik asit (PBA) ve APBA duyarlılığına dayanır. Yapısal olarak beta-laktamlara benzeyen boronat türevleri, beta-laktamazların fonksiyonunun (özellikle sınıf C enzimler için) araştırılmasında uzun zamandır kullanılmaktadır. 2008'de Pasteran ve ark. (110) boronatların tercihen KPC tipi beta-laktamazları inhibe ettiğini gözlemledi. Bunu, çoğunluğu kombine disk testi formatındaki, bir karbapenemle kombine boronik asitlerin kullanıldığı tayin tekniklerini öneren çalışmalar takip etti.

Kullanılan boronatlardan PBA'nın KPC'ye karşı inhibitör aktivitesinin APBA'ya göre muhtemelen daha yüksek olduğu bildirilmiştir. Ayrıca hem KPC, hem MBL tipi karbapenemaz üreten suşların tayini için aynı agarda sadece meropenem, PBA+meropenem, EDTA+meropenem ve PBA+EDTA+meropenem disklerini içeren kombine disk testinde sadece PBA+EDTA+meropenem kombinasyon diskinin çevresinde ≥ 5 mm'lik artış olması KPC ve MBL ortak üretimini göstermektedir (111). EUCAST de sık görülen direnç profilleri rehberinde bu direnç profilinin tayini için APBA+DPA kombinasyonunun kullanımını önermiştir. Ancak bu kullanımın doğruluğu yeterince test edilmemiştir (78).

Yukarıda tarif edilen MBL tayin testleri gibi, KPC üreticilerinin boronat bazlı tayini konusunda da deneyim, esas olarak *K. pneumoniae* ile kısıtlıdır. AmpC tipi beta-laktamaz (sefalosporinaz) üreten izolatlar için, boronik asit türevleri bu enzimlerin potansiyel inhibitörleri olduğu için, özgüllük problemleri ortaya çıkabilir. Tercihen sefalosporinazları inhibe eden kloksasilinin eş zamanlı kullanımı, bu problemi kısmen hafifletebilir (112). Ayrıca VIM beta-laktamaz ortak üretimi söz konusuysen boronat bazlı yöntemlerin KPC pozitif *K. pneumoniae* tayininde etkisiz kalacağına dikkat edilmelidir (113).

Kromojenik Besiyeri Kullanımı ile Tayin

Farklı karbapenemaz üreten mikroorganizmaların tanınmasına imkan sağlayan ticari olarak en azından iki seçici agar besiyeri bulunmaktadır: CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Paris, Fransa) ve Brilliance CRE agar (Oxoid, Thermofisher Scientific)

Türler koloni rengi ile ayırt edilir. Bu besiyerlerinin güvenilirliği titizlikle değerlendirilmemiştir. Yine de çeşitli durumlarda sürveyans kültürleri için başarı ile kullanılmışlardır (114).

CarbaNP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) Testi

KÜE identifikasyonunda son ve en önemli gelişme CarbaNP testidir. İzole edilmiş bakteri kolonilerine uygulanabilecek bu biyokimyasal test, imipenemin *in vitro* hidrolizine dayanır. İmipenem hidrolizi indikatörün pH değerindeki değişikliklerle (kırmızıdan sarıya/turuncuya) saptanır. Bu testin duyarlılığı ve özgüllüğü moleküler teknikler gibi %100'dür. Moleküler tekniklerin aksine, *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde (Ambler A, B ve D sınıflarına ait) bilinen tüm karbapenemazların yanında yeni ortaya çıkan karbapenemazları da tanımlayabilir. Bu hızlı sonuç veren (<2 saat), kolay ve pahalı olmayan teknik dünya çapında her laboratuvarında uygulanabilir. Ayrıca özel ekipman gerektirmez. KÜE identifikasyonu için klinikte duyulan hızlı ve maliyet etkin yöntem ihtiyacını karşılayabilen bu yöntemin yakın zamanda referans teknik olacağına inanılmaktadır (81). EUCAST tarafından da KÜE tayini için MALDI-TOF ile birlikte önerilen iki yöntemden biridir (78).

Karbapenemaz Genlerinin Moleküler Tayini

Fenotipik tayin yöntemleri ile ilgili problemleri bertaraf etmek ve raporlama sürelerini kısaltmak için, çoğu klinik laboratuvar, karbapenemaz genlerinin tayini için *in-house* polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bazlı yöntemleri kullanmaktadır. Ayrıca PCR bazlı yöntemler spesifik fenotipik test geliştirilmemiş olan OXA tipi karbapenemazların tayinine imkan verir. Her *bla* gen grubu için kullanılması gereken oligonükleotid primerleri için bir görüş birliği olmasa da, tek bir karbapenemaz tipini hedefleyen tekli PCR yöntemleri birden çok çalışmada başarı ile kullanılmıştır. Birden çok karbapenemaz gen tipinin identifikasyonuna imkan veren ve tayin süresini kısaltan çoklu ve eş zamanlı PCR yöntemleri de kullanılmıştır (83). Ayrıca eş zamanlı PCR yöntemlerini karbapenemaz gen varyantlarının kesin tayinine imkan veren bir erime eğrisi basamağı da takip edebilir (115). Ana karbapenemaz gen tiplerinin tayini için PCR ve hibridizasyon bazlı kitler (örneğin Hyplex MBL ID ve Hyplex CarbOxa ID kits [BAG Health Care, Lich, Almanya]) endüstriyel olarak geliştirilmiştir. Üreticiler bu yöntemlerin klinik örneklerde direkt kullanılabileceğini iddia etseler de (116), tamsal yararlılıkları farklı yerlerde sistematik olarak değerlendirilmek üzere beklemektedir. Çoklu direnç faktörlerinin hızlı ve güvenilir tayinini amaçlayan moleküler yöntemler listesine son olarak *microarray* teknolojisi eklenmiştir. Check KPC/ESBL *microarray* ve genişletilmiş versiyonu Check-MDR CT102 (Check-Points Health BV, Wageningen, Hollanda) klinikle en ilişkili karbapenemaz genleri de dahil geniş çeşitlilikte *bla* genlerinin tek bir tüp içinde tayininde başarı ile uygulanmıştır (117,118). Tüm moleküler yöntemler ile ilgili bir sorun; saptanacak direnç genlerinin önceden tanımlanmış olmasıdır, bu yüzden bu yöntemler yeni gen tiplerini kaçırabilir.

Karbapenemaz Aktivitesinin Spektrofotometri ile Tayini

Karbapenemaz aktivitesinin spektrofotometri ile değerlendirilmesi, ham veya kısmen arıtılmış enzim ekstraktları ve bir karbapenem (sıklıkla imipenem) kullanılarak uygulanır. Karbapenemaz aktivitesinin doğrulanmasında referans yöntem olarak kabul edilir. Ama bu teknik olarak zahmetli yöntem referans laboratuvarlarıyla kısıtlıdır (119).

Karbapenemaz Aktivitesinin Kütle Spektrometrisi ile Tayini

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (*Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry* [MALDI-TOFMS]) karbapenemaz aktivitesinin tanınmasında son gelişmedir. Yöntem, test edilen materyalin yüksek vakumda iyonizasyonu ve sonra bir elektrik alandaki hızlanmasına dayanır. Parçaların boyutları, elektrik alandaki uçuş sürelerinden anlaşılabilir. MALDI-TOFMS klinik laboratuvarlara esas olarak tür tanımlaması amacıyla getirildi. Ancak yöntem çok yönlüdür ve çeşitli bileşenlerin (antibiyotik yıkım ürünleri dahil) tanınması için de kullanılabilir. Son olarak MALDI-TOFMS karbapenem hidroliz ürünlerini belirlemek ve böylece gram negatif basillerdeki karbapenemaz aktivitesini doğrulamak için başarıyla kullanıldı. Yine de bu yöntem ile ilgili tecrübe hala kısıtlıdır (120,121).

2.4.4. Karbapenemaz Üretici Bakteri Taşıyıcılığının Taranması

Karbapenemaz üreticilerinin yayılımının önlenmesi hastane birimlerindeki taşıyıcıların erken ve kesin tanısına bağlıdır. Birden çok ülkede taranması gereken hastalar hakkında öneriler ve rehberlikte bulunuldu, ancak taranması zorunlu hasta profili ülkeden ülkeye önemli farklılıklar gösterir (122,123). Tarama, en azından yoğun bakım ünitesi ve transplant hastalarını ve immun düşük hastaları içermelidir. Eğer bir hastanın KÜE ile enfekte veya kolonize olduğu onaylanırsa, servisteki komşu hastalar da tarama programına dahil edilmelidir. En azından yabancı bir hastaneden herhangi bir servise transfer edilen hastalara da tarama uygulanabilir. *Enterobacteriaceae* suşlarının asıl rezervuarı bağırsak olduğu için dışkı ve rektal sürüntü örnekleri tarama sürecine tabi tutulacak en uygun örneklerdir. Bu örnekler tarama besiyerine direkt veya imipenem 0.5–1 mg/L veya ertapenem 0.5 mg/L içeren broth'ta 18 saatlik zenginleştirmeden sonra ekilebilir (124,125). Bu zenginleştirmenin faydalı olduğu, KPC üreticilerinin tayinini arttırdığı gösterilmiş olmasına rağmen geniş ölçüde değerlendirilmemiştir (124). Bir salgında veya dışkıda KÜE bulunduğu zaman başka taşıyıcıların taranması için uygulandığında faydalı olabilir. Bu basamağın dezavantajı, sonucu 18-24 saat geciktirmesidir, bu yüzden örnek hastadan alındıktan sonra karbapenemaz aktivitesi pozitif ya da negatif demek için gereken süre 72 saate çıkar. Dışkı veya rektal sürüntü örnekleri selektif besiyerine ekil-

melidir. KÜE tarafından karbapenemlere gösterilen direncin düzeyi belirgin şekilde değişkendir ve yüksek düzeyde direnç göstermezlerse tayinleri güçleşir.

Birden çok çalışmaya göre besiyerinde kullanılan 1-2 mg/L'lik imipenem konsantrasyonu düşük düzeyde direnç gösteren karbapenemaz üreticilerinin (örneğin OXA-48, OXA-181 üreticileri) yeterli tayini için çok yüksek bir konsantrasyon olabilir. Bu nedenle duyarlılık düşük, özgüllük yüksek olur.

GSBL üreticilerini taramak için tasarlanan ve sefpodoksim içeren bir besiyeri (ChromID ESBL [bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa]) ile karbapenem içeren bir besiyeri (CHROMagar KPC) karbapenemaz üreticilerinin taraması için değerlendirilmiştir. Her iki besiyeri de *Enterobacteriaceae* türlerinin tanınmasını sağlayan kromojenik moleküller içerir (126,127).

ChromID ESBL mükemmel duyarlılığa sahiptir ancak ana dezavantajı, sefpodoksime duyarlı olan OXA-48 benzeri üreticileri saptamadaki eksikliğidir, ayrıca GSBL üreticilerini izole etmek için geliştirildiğinden karbapenemaz üreticileri için özgüllüğü düşüktür (128). GSBL üreticisi taşıyıcılığı dünya çapında yaygınlaştığından bu önemli bir husustur ve karbapenem direnci açısından kolonilerin ilave testlere tabi tutulması zorunludur.

CHROMagar KPC sadece yüksek düzey karbapenem direnci gösteren karbapenemaz üreticilerini saptar. Bu nedenle ana dezavantajı duyarlılığının düşük olmasıdır (129).

Yaygın olarak değerlendirilmiş olmamasına rağmen biri GSBL tarama plağı, biri de ertapanem diski veya E test stripi yerleştirilmiş olan Drigalski plağı olmak üzere 2 paralel plağın kullanımı ile karbapenemaz üreticilerinin saptanması mümkün olabilir (130,131). Son dönemde çinko, kloksasilin ve OXA-48 dahil tüm karbapenemaz üreticilerinin saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan bir karbapenem molekülü içeren bir besiyeri (SUPERcarba) geliştirilmiştir (132).

Bu kültür bazlı testlerin hiçbiri karbapenemazın tipini tanımlamaya yetmez. Tarama sürecinde sonuçlar elde edilmeden önce hastalar 48 saat sıkı izolasyonda tutulmalıdır. Bu tarama basamağından sonra karbapenemaz üreticisi yukarıda tarif edilen tekniklerle tanımlanmalıdır.

Son zamanlarda direkt dışkıya uygulanan PCR bazlı teknikler KPC ve NDM-1 üreticilerinin hızlı tayini için önerilmiştir (133,134)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. İzolatların Tanımlanması

Çalışmamız Etik Kurul tarafından 12 Ocak 2012 tarihinde 21 sayılı karar ile onaylandı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi (ESOGÜ) Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, Mayıs 2010-Mayıs 2013 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve Phoenix otomatize sistemi ile *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi olarak tanımlanan 8494 suştan 524'ünde, yine otomatize sistem sonuçlarına göre imipenem, ertapenem ve meropenem antibiyotiklerinden en az birine karşı CLSI kriterlerine göre MİK artışı (ertapenem için $>0,5$ $\mu\text{g/ml}$ imipenem ve meropenem için >1 $\mu\text{g/ml}$) saptandı ve bunlardan 190'ı çalışma kapsamına alındı. Tablo 3.1'de *Enterobacteriaceae* için CLSI karbapenem MİK ve zon çapı sınır değerleri verilmiştir.

Tablo 3.1 CLSI karbapenem MİK ve zon çapı sınır değerleri (20)

	MİK sınır değeri (mg/L)		Disk içeriği (μg)	Zon çapı sınır değeri (mm)	
	S \leq	R \geq		S \geq	R $<$
Doripenem	1	4	10	23	20
Ertapenem	0,5	2	10	22	19
İmipenem	1	4	10	23	20
Meropenem	1	4	10	23	20

Aynı hastadan üretilen aynı tür bakteriler çalışmaya dahil edilmedi. Suşlar çalışılncaya kadar %15 gliserollü triptik soy *broth* içeren boncuklu tüplerde -70⁰C'de saklandı.

Ayrıca ESOGÜ Tıp Fakültesinde farklı servislerde yatmakta olan 210 farklı hastadan alınan rektal sürüntü örnekleri 1 µg/ml konsantrasyonda imipenem içeren *eosin methylene blue* (EMB) agar besiyerine ekildi. Öncelikle imipenem için hem çözücü, hem sulandırıcı olarak pH'ı 7,2 olan 0.01 M fosfat tamponu kullanıldı. Besiyeri otoklavdan çıktıktan sonra, yaklaşık 52-55°C'de, son konsantrasyon 1 µg/ml olacak şekilde besiyerine imipenem ilave edildi. Rektal sürüntü örnekleri bekletilmeden ekildi ve 35°C'de bir gecelik inkübasyondan sonra üreme saptanan besiyerlerindeki izolatlar ileri incemeye alındı. Antibiyotiğin etki gücünü kaybetme ihtimaline karşılık bir geceden sonra değerlendirilme yapılmadı. Üreyen bakterilerden *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas* spp. Gram boyama, EMB agar besiyerindeki koloni morfolojileri, TSI, MİO, üreaz ve sitrat besiyerlerindeki reaksiyonlarına göre geleneksel yöntemlerle, *Stenotrophomonas maltophilia* ise az önce sayılanlara ilave olarak Phoenix otomatize sistemiyle tanımlandı.

3.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Disk Difüzyon Yöntemi

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında CLSI standartlarına uygun olarak Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle imipenem, meropenem ve ertapenem duyarlılıkları çalışıldı. *Enterobacteriaceae* izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni suspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon kaldırıldıktan sonra tüpün kenarına hafifçe bastırılarak eküvyon üzerindeki fazla sıvı atıldı. Önceden kurutulmuş, 4 mm kalınlığındaki MH agar plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edildi. Bakteri süspansiyonunun absorbe olması için kapak aralık olarak birkaç dakika beklendikten sonra 10 µg imipenem (Bioanalyse), 10µg meropenem (Bioanalyse) ve 10 µg ertapenem (Bioanalyse) içeren antibiyotik diskleri aralarında 24 mm olacak şekilde yüzeylerine bastırılarak yerleştirildi. Kalite kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. 15 dakika içinde kapakları alta gelecek şekilde 35°C'lik etüve kaldırıldı ve 16-20 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi. CLSI standartlarına göre inhibisyon zon çap-

ları ölçülerek duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi (20). Ayrıca KÜE taraması için karbapenem içeren EMB agar besiyerinde kültürü yapılan rektal sürüntü örneklerinden üretilen *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi izolatlarla da CLSI önerilerine uygun olarak meropenem disk difüzyon testi ve OXA varlığı açısından şüpheli bulunan izolatlarla da CLSI önerilerine uygun olarak 100/10 µg piperasilin/tazobaktam (Bioanalyse) içeren diskler ile difüzyon testi uygulandı.

Etest Yöntemi

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında üretici firma talimatlarına uygun olarak Etest yöntemiyle (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri saptandı. *Enterobacteriaceae* izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni süspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon daldırıldıktan sonra tüpün kenarına hafifçe bastırılarak eküvyon üzerindeki fazla sıvı atıldı. Önceden kurutulmuş, 4 mm kalınlığındaki MH agar plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edildi. Bakteri süspansiyonunun absorbe olması için kapak aralık olarak birkaç dakika beklendikten sonra +8 ile -20°C arasında saklanan Etest şeritleri agar yüzeyine yerleştirildi. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı. Kapakları alta gelecek şekilde 35°C'lik etüve kaldırıldı ve 16-20 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi. MİK değerleri saptanarak CLSI standartlarına göre (Bkz. Tablo 3.1) duyarlı, orta derecede duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi (20). Ayrıca KÜE taraması için karbapenem içeren EMB agar besiyerinde kültürü yapılan rektal sürüntü örneklerinde üreyen *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi izolatlarla da, üretici firma talimatlarına uygun olarak meropenem Etest uygulandı.

3.3. AmpC ve GSBL Üretimini Saptanması

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan, imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı (ertapenem için <22 mm, imipenem ve meropenem için <23 mm)

veya Etest yöntemi ile artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında kombine disk difüzyon yöntemi ile fenotipik GSBL ve AmpC tayini yapıldı (20, 135,136).

Öncelikle AmpC tayininde kullanılacak olan kombine diskler hazırlandı. Çözücü olarak steril su kullanılarak (112) 20 mg/ml'lik kloksasilin (Sigma, Katalog no: 27555) solüsyonu hazırlandı ve bundan 30 µg'lık sefoksitin (Bioanalyse) diskleri üzerine 10'ar µl dağıtılarak sefoksitin+kloksasilin diskleri elde edildi (135). Diskler oda ısısında yarım saat kurumaya bırakıldı ve bekletilmeden kullanıldı (112).

Enterobacteriaceae izolatlarının bir gecelik taze pasajında tek düşmüş kolonilerden doğrudan koloni süspansiyonu yöntemiyle 0,5 McFarland bulanıklığa eşdeğer bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril eküvyon daldırıldıktan sonra tüpün kenarına hafifçe bastırılarak eküvyon üzerindeki fazla sıvı atıldı. Önceden kurutulmuş, 4 mm kalınlığındaki MH agar plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edildi. Bakteri süspansiyonunun absorbe olması için kapak aralık olarak birkaç dakika beklendikten sonra 30 µg seftazidim (Bioanalyse), 30 µg sefotaksim (Bioanalyse), 30/10 µg seftazidim/klavulanat (Bioanalyse), 30/10 µg sefotaksim/klavulanat (Bioanalyse), 30 µg sefoksitin ve önceden hazırlanmış sefoksitin+kloksasilin diskleri merkezleri arasında en az 24 mm olacak şekilde agar yüzeyine bastırılarak yerleştirildi. Kalite kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922 (AmpC ve GSBL negatif) ve *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603 (GSBL pozitif) ve *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* ATCC BAA-1143 (AmpC pozitif) standart suşları kullanıldı. Kapakları alta gelecek şekilde 37⁰C'lik etüve kaldırıldı ve 16-18 saat inkübasyonun ardından değerlendirildi.

Seftazidim veya sefotaksim klavulanat ile kombine diskinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise GSBL pozitif kabul edildi (20). Sefoksitin kloksasilin ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 4 mm veya daha fazla ise AmpC pozitif kabul edildi (135).

3.4. Karbapenemaz Üretiminin Saptanması

Modifiye Hodge Yöntemi

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan, imipenem,

meropenem veya ertapenemden en az birine Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemi ile artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamına CLSI standartlarına uygun olarak MHT ile fenotipik karbapenemaz tayini yapıldı. Serum fizyolojik (SF) ile *E. coli* ATCC 25922 suşundan 0,5 McFarland değerinde süspansiyon hazırlandı ve yine SF ile 1/10 oranında dilüe edildi. Önceden kurutulmuş, 4 mm kalınlığındaki MH agar plağının yüzeyine sürülerek bakteri tüm agar yüzeyine inoküle edildi. 3-10 dakika plağın kuruması beklendikten sonra plağın ortasına 10 µg meropenem diski (Oxoid) yerleştirildi. 10 µl'lik öze ile kanlı agarda bir gecelik kültürdeki test suşundan 3-5 koloni alındı ve diskin kenarından dışa doğru çizgi şeklinde ekildi. Çizgiler en az 20-25 mm uzunluğundaydı. Kalite kontrol için *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC BAA-1705 (MHT pozitif) ve *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC BAA-1706 (MHT negatif) standart suşları kullanıldı. 35°C'de 16-20 saat inkübasyondan sonra disk etrafındaki inhibisyon zonunda meydana gelen yonca yaprağı şeklindeki bozulma karbapenemaz üretimi açısından pozitif sonuç olarak değerlendirildi (20).

3.5. Karbapenem Direnç Mekanizmasının Tayini

3.5.1. "AmpC Beta-laktamaz+Porin Kaybı" Tayini

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan, imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemi ile artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında inhibitör olarak kloksasilin (Sigma, Katalog no: 27555) kullanılarak kombine diskler ile "AmpC beta-laktamaz+Porin kaybı" mekanizmasının varlığı araştırıldı (78).

Öncelikle çözücü olarak steril distile su kullanılarak 75 mg/mL kloksasilin çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden pipetle 10'ar µL, 10 µg'lik meropenem disklerinin (Bioanalyse) üstüne damlatıldı. Diskler kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı (112).

Test edilecek suşlara CLSI önerilerine uygun olarak meropenem 10µg ve meropenem+kloksasilin ile disk difüzyon testi uygulandı. Meropenemin kloksasilin

ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise “AmpC beta-laktamaz+Porin kaybı” mekanizmasının varlığı pozitif kabul edildi (78).

Tablo 3.5’te karbapenem direnç mekanizmasının kombine diskler kullanılarak belirlenmesi için EUCAST’in önerdiği yorumlama tablosu gösterilmiştir.

Tablo 3.5. Kombine disk yöntemleri ile yapılan fenotipik testlerin yorumlanması (78)

β-lactamase	10 µg disk ile meropenem zon çapında (mm)				Temosilin MIC >32 mg/L
	artış olarak gözlenen sinerji				
	DPA/EDTA	APBA/PBA	DPA+APBA	KLOKS	
MBL	≥5	-	-	-	*
KPC	-	≥4	-	-	*
MBL+KPC	değişken	değişken	≥5	-	*
OXA-48-şüpheli	-	-	-	-	+
AmpC+Porin kaybı	-	≥4	-	≥5	*
GSBL+Porin kaybı	-	-	-	-	-

DPA: Dipikolinik asit, EDTA: Etilendiamintetraasetik asit, PBA: Fenilboronik asit, KLOKS: Kloksasilin

* Temosilin sadece sinerji saptanmayan olgularda “GSBL+Porin kaybı” ve OXA-48 şüpheli profillerini ayırt etmek için önerilir.

3.5.2. KPC Tayini

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan, imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemi ile artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında inhibitör olarak PBA (Sigma, Katalog no: P20009) ve APBA (Sigma, Katalog no: 410705) kullanılarak kombine diskler ile KPC varlığı araştırıldı (78).

Öncelikle çözücü olarak steril distile su kullanılarak 60 mg/ml'lik APBA çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden pipetle 10'ar μL , 10 μg 'lik meropenem disklerinin (Bioanalyse) üstüne damlatıldı ve böylece meropenem+APBA diskleri elde edildi. Ayrıca 120 mg PBA, 3 ml DMSO'da çözüldü ve bu solüsyona 3 ml'lik distile steril su eklendi. Bu son solüsyondan 20'şer μL , 10 μg meropenem disklerinin (Bioanalyse) üstüne damlatıldı ve böylece meropenem+PBA diskleri elde edildi. Diskler kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı (112, 137).

Test edilecek suşlara CLSI önerilerine uygun olarak meropenem 10 μg , meropenem+APBA ve meropenem+PBA ile disk difüzyon testi uygulandı.

Meropenemin PBA ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 4 mm veya daha fazla ise ve "AmpC+Porin kaybı" mekanizması tayininde kloksasilin ile sinerji de yoksa KPC pozitif kabul edildi.

Meropenemin APBA ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 4 mm veya daha fazla ise ve "AmpC+Porin kaybı" mekanizması tayininde kloksasilin ile sinerji de yoksa KPC pozitif kabul edildi (78,138). (Bkz. Tablo 3.5)

Kalite kontrol için KPC pozitif kontrol suşu olarak *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC BAA-1705, KPC negatif kontrol suşu olarak da *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

3.5.3. MBL Tayini

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan, imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine Bauer-Kirby disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemi ile artmış MİK değeri gösteren izolatların tamamında inhibitör olarak EDTA (Sigma, Katalog no: E5134) ve DPA (Sigma, Katalog no: P42800) kullanılarak kombine diskler ile MBL varlığı araştırıldı (78).

Öncelikle çözücü olarak steril distile su kullanılarak 0,2 M'lik EDTA çözeltisi hazırlandı. Bu çözeltiden pipetle 10'ar μL , 10 μg 'lik meropenem disklerinin (Bioanalyse) üstüne damlatıldı. Böylece meropenem+EDTA diskleri elde edildi. Ay-

rıca çözücü olarak DMSO kullanılarak 100 mg/ml DPA solüsyonu hazırlandı. Bu çözümden pipetle 10'ar μL 10 μg 'lik meropenem disklerinin üstüne damlatıldı. Böylece meropenem+DPA diskleri elde edildi. Diskler kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı (112).

Test edilecek suşlara CLSI önerilerine uygun olarak meropenem 10 μg , meropenem+EDTA ve meropenem+DPA ile disk difüzyon testi uygulandı. Meropenemin EDTA veya DPA ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise MBL pozitif kabul edildi (78). (Bkz. Tablo 3.5)

Ayrıca MBL pozitif saptanmasına rağmen aztreonama da dirençli olan izolatlarda bu direncin olası sebebi olarak MBL varlığı nedeniyle kombine disk testinde maskelenmiş GSBL araştırılmıştır. Bunun için çözücü olarak DMSO kullanılarak 100 mg/ml DPA solüsyonu hazırlandı. Bu çözümden pipetle 10'ar μL , 30 μg seftazidim (Bioanalyse), 30 μg sefotaksim (Bioanalyse), 30/10 μg seftazidim/klavulanat (Bioanalyse), 30/10 μg sefotaksim/klavulanat (Bioanalyse) disklerine damlatıldı. Diskler kullanılmadan önce oda sıcaklığında 30 dakika kurumaya bırakıldı (112).

Test edilecek suşlara CLSI önerilerine uygun olarak seftazidim+DPA, sefotaksim+DPA, seftazidim/klavulanat+DPA, sefotaksim/klavulanat+DPA ile disk difüzyon testi uygulandı. Seftazidim/klavulanat+DPA diskinin çevresindeki zon çapı, seftazidim+DPA diskinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise veya sefotaksim/klavulanat+DPA diskinin çevresindeki zon çapı, sefotaksim+DPA diskinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise GSBL pozitif kabul edildi (20).

3.5.4. “KPC+MBL” Tayini

Hem KPC tayin testinde PBA ve/veya APBA ilavesiyle meropenem zon çapında artış görülen, hem de MBL tayin testinde EDTA ve/veya DPA ilavesiyle meropenem zon çapında artış görülen izolatların tamamında inhibitör olarak APBA ve DPA birlikte kullanılarak kombine disk ile “KPC+MBL” varlığı araştırıldı (78).

Çözücü olarak steril distile su kullanılarak hazırlanmış 60 mg/ml'lik APBA solüsyonundan 10'ar μL ve çözücü olarak DMSO kullanılarak hazırlanmış 100

mg/ml'lik DPA solüsyonundan 10'ar μ L 10 μ g'lik meropenem disklerinin (Bioanalyse) üstüne birlikte damlatıldı (78, 112).

Meropenemin APBA ve DPA ile kombine halinin çevresindeki zon çapı, antibiyotiğin tek başına olan halinin çevresindeki zon çapından 5 mm veya daha fazla ise "KPC+MBL" mekanizmasının varlığı pozitif kabul edildi (78). (Bkz. Tablo 3.5)

3.5.5. OXA-48 ve Benzeri Profil ve "GSBL+Porin Kaybı" Tayini

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri gösterdiği Etest yöntemi ile doğrulanan ancak KPC, "AmpC+Porin kaybı" ve MBL mekanizmaları açısından fenotipik tayin testleri negatif bulunan suşlarda üretici firma talimatlarına uygun olarak Etest (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa) yöntemi ile temosilin MİK değerleri saptandı.

Temosilin MİK değeri >32 mg/L olarak saptanan suşlar OXA-48 ve benzeri profil olarak değerlendirilirken, ≤ 32 mg/L olarak saptanan GSBL pozitif suşlardaki karbapenem direnç mekanizması ise "GSBL+Porin kaybı" olarak değerlendirildi (78). (Bkz. Tablo 3.5)

4. BULGULAR

Çalışma kapsamına alınan 2009-2013 tarihleri arasında 158'i servis, 32'si poliklinik hastalarından izole edilmiş 190 *Enterobacteriaceae* izolatının, 58'i (%30,5) pediatri, 40'ı (%21) pediatri yoğun bakım, 38'i (%20) anestezi yoğun bakım, 20'si (%11) dahiliye, 10'u (%5,5) üroloji, 4'ü (%1) dahiliye yoğun bakım, 20'si (%11) diğer birim hastalarından alınan klinik örneklerden soyutlanmıştır. Poliklinik hastalarının 24'ü pediatrik hastalardır. Suşların 87'si (%46) yoğun bakım hastalarına ait klinik örneklerden izole edilmiştir.

Klinik örneklerin 107'si (%56) idrar, 35'i (%18) kan, 30'u (%17) solunum yolu, 12'si (%6) yara, 3'ü (%1,5) kateter, 3'ü (%1,5) abse drenaj örneğidir.

Örneklerden soyutlanan izolatların Phoenix otomatize sistemi ile 133'ü (%70) *K. pneumoniae*, 22'si (%12) *E. coli*, 18'i (%9,5) *E. cloacae*, 8'i (%4) *E. aerogenes*, 3'ü (%1,5) *K. oxytoca*, 3'ü (%1,5) *S. marcescens*, 2'si (%1) *M. morgani*, 1'i de (%0,5) *S. plymuthica* olarak tanımlandı.

Çalışılan izolatların Phoenix otomatize sistemiyle imipeneme 71'i (%37) duyarlı, 23'ü (%12) orta derecede duyarlı, 96'sı (%51) dirençli bulunmuştur. Meropeneme, suşların 81'i (%42,5) duyarlı, 32'si (%17) orta derecede duyarlı ve 77'si (%40,5) dirençli, ertapeneme ise 22'si (%12) duyarlı, 6'sı (%3) orta derecede duyarlı, 162'si (%85) dirençli bulunmuştur.

İmipenem için disk difüzyon testiyle izolatların 119'u (%62,5) duyarlı, 43'ü (%22,5) orta derecede duyarlı, 28'i (%15) dirençli bulunmuştur. Meropenem için disk difüzyon test sonuçları 109'u (%57) duyarlı, 49'u (%26) orta derecede duyarlı, 32'si (%17) dirençli, ertapenem için ise 61'i (%32) duyarlı, 35'i (%18,5) orta derecede duyarlı, 94'ü (%49,5) dirençli şeklindedir.

Etest yöntemiyle imipeneme suşların 125'i (%66) duyarlı, 42'si (%22) orta derecede duyarlı, 23'ü (%12) dirençli bulunurken, meropenem için sonuçlar 123'ü (%65) duyarlı, 41'i (%21,5) orta derecede duyarlı ve 26'sı (%13,5) dirençli, ertapenem için ise 87'si (%46) duyarlı, 19'u (%10) orta derecede duyarlı ve 84'ü (%44) dirençli şeklindedir.

Etest yöntemiyle karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri gösteren 104 izolat saptanırken, disk difüzyon yöntemiyle karbapenemlerden en az birine azalmış zon çapı gösteren izolat sayısı ise 129 olmuştur.

İzolatların duyarlılıklarının yöntemlere göre dağılımı Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te gösterilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların imipenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı

İmipenem	Phoenix	DD	E test
	n(%)	n(%)	n(%)
Duyarlı	71(37)	119(62,5)	125(66)
ODD	23(12)	43(22,5)	42(22)
Dirençli	96(51)	28(15)	23(12)

DD: Disk difüzyon ODD: Orta derece duyarlı

Tablo 4.2. İzolatların meropenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı

Meropenem	Phoenix	DD	E test
	n(%)	n(%)	n(%)
Duyarlı	81(42,5)	109(57)	123(65)
ODD	32(17)	49(26)	41(21,5)
Dirençli	77(40,5)	32(17)	26(13,5)

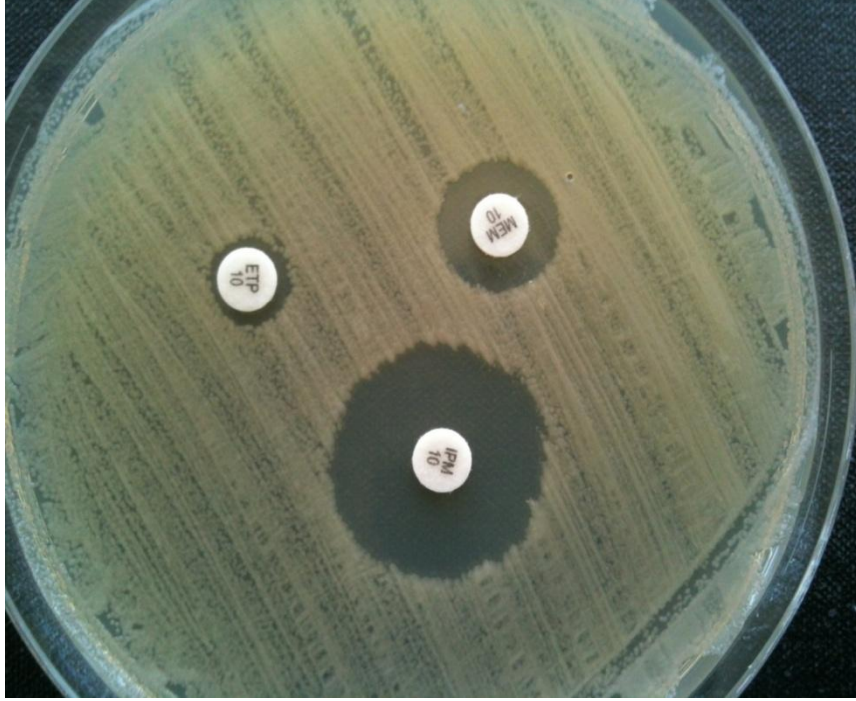
DD: Disk difüzyon ODD: Orta derece duyarlı

Tablo 4.3. İzolatların ertapenem duyarlılığının yöntemlere göre dağılımı

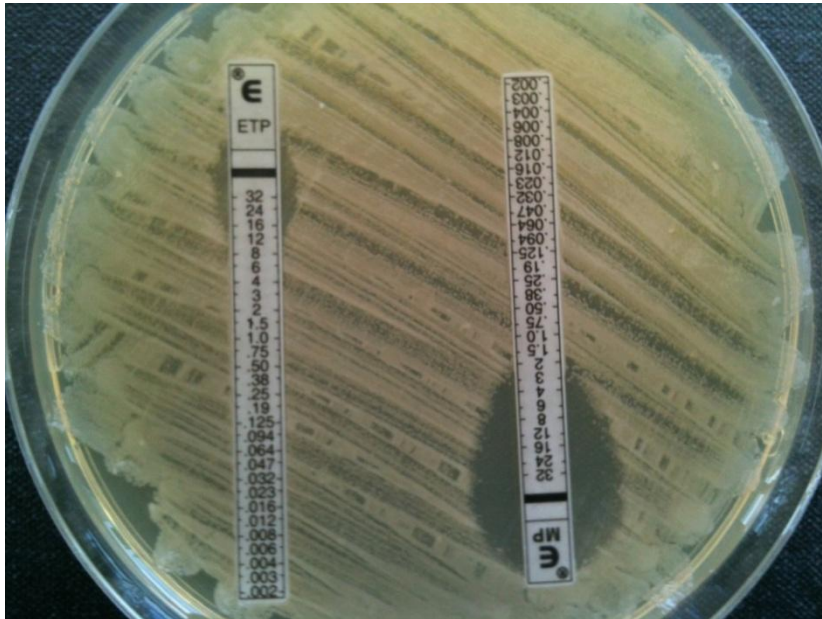
Ertapenem	Phoenix	DD	E test
	n(%)	n(%)	n(%)
Duyarlı	22(12)	61(32)	87(46)
ODD	6(3)	35(18,5)	19(10)

Dirençli	162(85)	94(49,5)	84(44)
-----------------	---------	----------	--------

DD: Disk difüzyon ODD: Orta derece duyarlı



Şekil 4.1. Disk difüzyon yöntemiyle karbapenem zon çapında azalma saptanan bir izolat



Şekil 4.2. Etest yöntemiyle karbapenem MiK değerlerinde artış saptanan bir izolat

Bizim çalışmamızda Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6’da gösterilmiştir. Dirençli suşların duyarlı olarak saptanması “çok büyük hata”, duyarlı suşların dirençli olarak saptanması “büyük hata”, dirençli veya duyarlı suşların orta derece duyarlı, ya da orta derece duyarlı suşların dirençli veya duyarlı saptanması “küçük hata” olarak kabul edilmiştir (139).

Tablo 4.4. Ertapenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu

	Ertapenem			
	Uyum (%)	Çok büyük hata (%)	Büyük hata (%)	Küçük hata (%)
Disk difüzyon	122/190 (%64,2)	-	30/190 (%15,8)	38/190 (%20)
Etest	112/190 (%58,9)	-	57/190 (%30)	21/190 (%11,1)

Tablo 4.5. İmipenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu

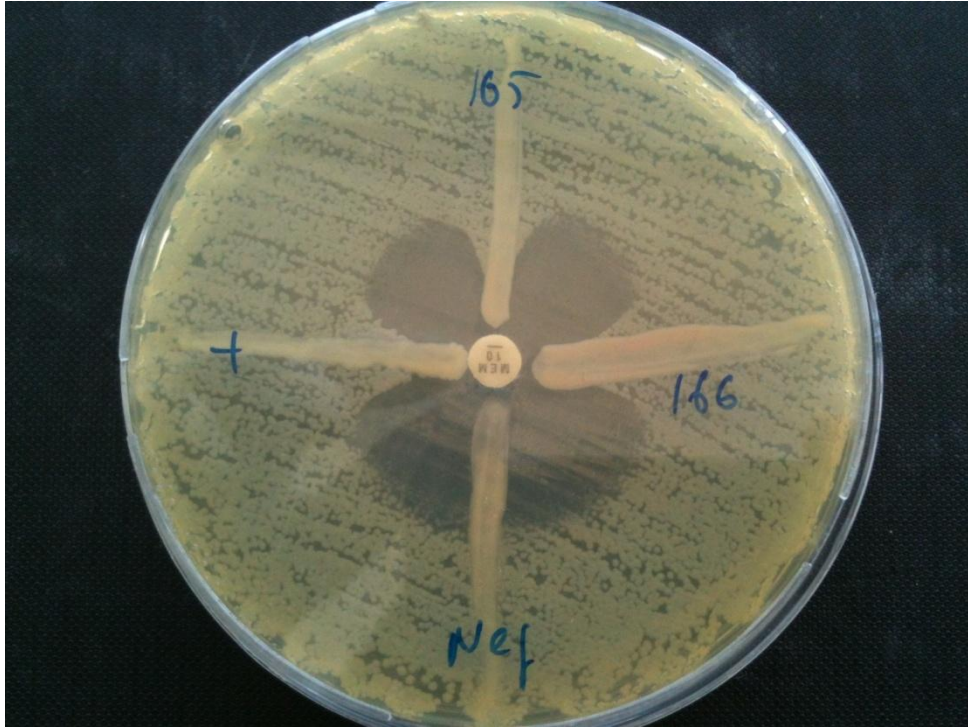
	İmipenem			
	Uyum (%)	Çok büyük hata (%)	Büyük hata (%)	Küçük hata (%)
Disk difüzyon	97/190 (%51,1)	-	40/190 (%21,1)	53/190 (%27,9)
Etest	96/190 (%50,5)	-	44/190 (%23,2)	50/190 (%26,3)

Tablo 4.6. Meropenem duyarlılığı tayininde Phoenix otomatize sisteminin disk difüzyon ve Etest yöntemleriyle uyumu

	Meropenem			
	Uyum (%)	Çok büyük hata (%)	Büyük hata (%)	Küçük hata (%)
Disk difüzyon	122/190 (%64,2)	-	21/190 (%11,1)	47/190 (%24,7)
Etest	120/190 (%63,2)	-	27/190 (%14,2)	43/190 (%22,6)

Mayıs 2010-Mayıs 2013 tarihleri arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına gelen klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında ertapenem duyarlılığı %93 (9203/9890) bulunurken, imipenem duyarlılığı %96,7 (10288/10634), meropenem duyarlılığı %97,7 (10816/11071) bulunmuştur.

Çalışma kapsamına alınan 190 izolattan karbapenemlerden en az birine disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemiyle artmış MİK değeri gösteren 129 izolatin tamamına karbapenemaz varlığının saptanması için MHT uygulan-
dı. Bu izolatların 90'ında(%69,7) MHT pozitif bulunurken, 39'unda(%30,3) negatif bulunmuştur. Kombine disk yöntemleri ile yapılan fenotipik karbapenem direnç mekanizması tayin testleriyle karbapenemaz ürettiği saptanan 91 suştan 8'inde MHT negatif bulunurken, GSBL ve/veya AmpC ve porin kaybından başka direnç mekanizması saptanmayan 38 suştan 7'sinde ise MHT pozitif saptanmıştır. Böylece karbapenem direnç mekanizması tayin testlerine göre MHT'nin duyarlılığı %91,2, özgüllüğü ise %81,5 bulunmuştur.



Şekil 4.3. Modifiye Hodge testi pozitif saptanan iki izolat

Çalışma kapsamına alınan 190 izolattan karbapenemlerden en az birine disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı veya Etest yöntemiyle artmış MİK değeri gösteren 129 izolatin tamamında kombine disk yöntemiyle fenotipik GSBL ve AmpC tayini yapıldı, 14 izolatta (%10,8) AmpC pozitifliği, 61 izolatta (%47,2) GSBL pozitifliği saptanmıştır. 4 izolatta (%3) AmpC ve GSBL pozitifliği birlikteydi. GSBL pozitifliği saptanan 61 izolattan 49'unda hem sefotaksim/klavulanat hem de seftazidim/klavulanat zon çapında artış görülmüş, 2'sinde sadece seftazidim-klavulanat, 10'unda ise sadece sefotaksim-klavulanat zon çapında artış görülmüştür. Sadece sefotaksim/klavulanat zon çapında artış görülen izolatlar CTX-M tipi GSBL varlığını düşündürmüştür. Tek başına AmpC pozitifliği veya AmpC ile birlikte GSBL pozitifliği saptanan izolatların hiçbiri disk difüzyon yöntemiyle sefoksitine duyarlı bulunmazken, beta-laktamaz olarak sadece GSBL içeren ve porin kaybı mekanizması bulunmayan 12 izolatin 10'u duyarlı, 2'si orta derecede duyarlı saptanmıştır.



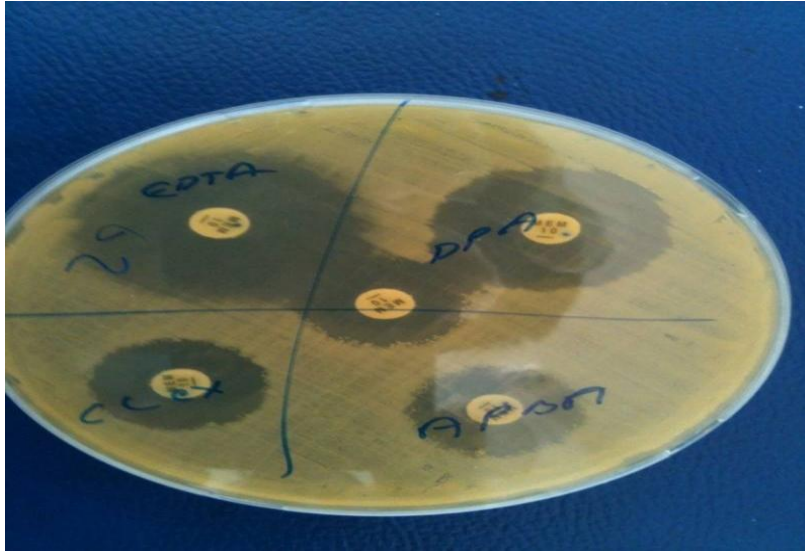
Şekil 4.4. Kombine disk yöntemiyle GSBL pozitif saptanan bir izolat



Şekil 4.5. Kombine disk yönteminde kloksasilin (“CLOX”) ilavesiyle AmpC pozitif saptanan bir izolat

Çalışma kapsamına alınan 190 izolattan karbapenemlerden en az birine disk difüzyon yöntemiyle azalmış zon çapı gösteren veya Etest yöntemiyle artmış MİK değeri gösteren 129 izolattın tamamında kombine disk yöntemleriyle fenotipik olarak KPC, MBL, “KPC+MBL” ve “AmpC+Porin kaybı” mekanizmalarının varlığı araştırılmıştır. 129 izolattan 31’inde hem EDTA ile hem DPA ile MBL pozitifliği saptanırken, 14’ünde PBA ile KPC pozitifliği, 10’unda APBA (PBA’ya göre başarı oranı %71,5) ile KPC pozitifliği saptandı, hiçbir izolatta “AmpC+Porin kaybı” mekanizması saptanmadı. 13 izolatta KPC ve MBL varlığı birlikteydi. KPC varlığının MBL saptanan 18 izolattın 10’u Phoenix otomatize sistemiyle aztreonama duyarlı bulunurken kalan 8 izolatta aztreonam direncinin olası sebebi olarak GSBL veya

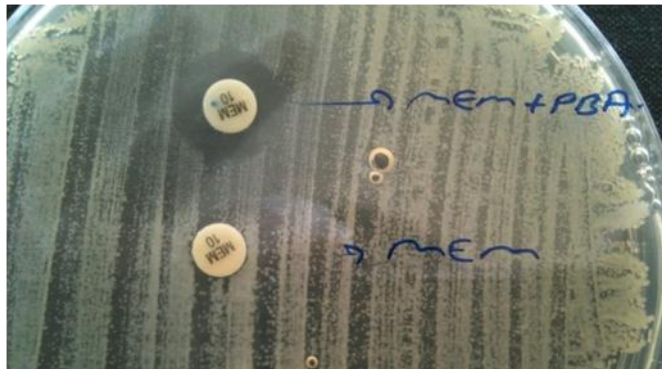
başka beta-laktamaz varlığı düşünülmüş ve inhibitör olarak klavulanat ile birlikte DPA da ilave edilmiş seftaksim ve seftazidim diskleri kullanılarak 3'ünde GSBL varlığı saptanmıştır. MBL saptanan izolatların tamamında disk difüzyon testinde karbapenem zon çaplarının 10 mm'den küçük ve MİK değerlerinin 32 mg/L'den büyük olması dikkat çekmektedir.



Şekil 4.6.
minde EDTA

Kombine disk yöntemi-
ve DPA ilavesiyle

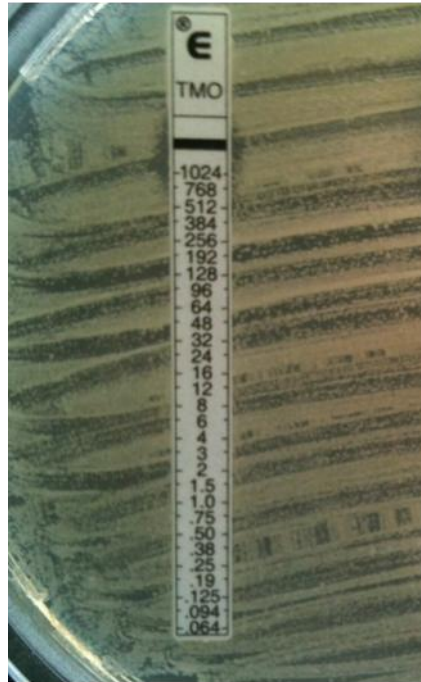
meropenem zon çapında artışın görüldüğü bir MBL pozitif izolat



Şekil 4.7. Kombine disk yönteminde PBA ilavesiyle meropenem zon çapında artışın görüldüğü bir KPC pozitif izolat

Phoenix otomatize sistemi ile imipenem, meropenem veya ertapenemden en az birine CLSI kriterlerine göre artmış MİK değeri gösteren izolatlardan karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri gösterdiği Etest yöntemi ile doğrulanan ancak KPC, “AmpC+Porin kaybı” ve MBL açısından fenotipik tayin testleri negatif bulunan 72 izolatın tamamında Etest yöntemiyle temosilin MİK değerleri ve disk difüzyon yöntemiyle araştırıldı.

Temosilin MİK değeri 32 mg/L’den büyük olup disk yöntemiyle GSBL fenotipik testi negatif bulunan 26 izolat, OXA varlığı açısından şüpheli olarak değerlendirildi. Temosilin MİK değeri 32’den küçük olup Etest yöntemi ile karbapenem MİK değeri artmış olan 13 tanesinde direnç mekanizması “GSBL+Porin kaybı” olarak değerlendirildi, bunlardan birinde mekanizmaya AmpC varlığı da eşlik ediyordu. 33 izolatta ise GSBL pozitif saptanmasına rağmen temosilin MİK değeri de yüksek bulundu, bu yüzden GSBL ile birlikte OXA varlığı düşünüldü. Ayrıca OXA varlığı açısından şüpheli bulunan 59’un izolatın tamamı disk difüzyon testi ile CLSI sınır değerlerine göre piperasilin/tazobaktama da dirençli bulundu.



Şekil 4.8. Temosilin Etest yöntemiyle MİK değeri >32 mg/L bir OXA-48 ve benzeri profil pozitif izolat

En az bir karbapeneme disk difüzyon yöntemi ile zon çapında azalma gösteren ancak Etest yöntemiyle tamamına duyarlı saptanan 25 izolattan 12'sinde sadece GSBL, 10'unda sadece AmpC, 3'ünde "AmpC+GSBL" birlikteliği vardı.

Sonuç olarak karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri saptanan 104 izolattan fenotipik testlerle direnç mekanizması olarak 33'ünde (%31,5) "GSBL+OXA-48 ve benzeri profil", 26'sında (%25) OXA-48 ve benzeri profil, 18'inde (%17,5) MBL, 13'ünde (%12,5) "KPC+MBL", 1'inde sadece KPC (%1), 13'ünde (%12,5) "GSBL+Porin kaybı" düşünülmüştür. Tablo 4.7'de karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri veya azalmış zon çapı saptanan suşlarda fenotipik test sonuçları gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri veya azalmış zon çapı saptanan suşlarda fenotipik test sonuçları

	OXA	OXA + GSBL	KPC + MBL	MBL	KPC	GSBL	AmpC	GSBL + Porin kaybı	GSBL + AmpC + Porin kaybı	GSBL + AmpC	Toplam
MHT(+)	24	33	11	14	1	4	0	3	0	0	90
MHT(-)	2	0	2	4	0	8	10	9	1	3	39
Toplam	26	33	13	18	1	12	10	12	1	3	129

Ayrıca karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri gösteren izolatlarda CLSI kriterleri baz alınıp Phoenix otomatize sistem sonuçlarına göre diğer antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır. Sonuçlar Tablo 4.8'e gösterilmiştir.

Tablo 4.8. Karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri saptanan suşlarda diğer antibiyotik duyarlılıkları

	Duyarlı	Orta derece duyarlı	Dirençli
Amoksisilin/klavulanat	-	2/54(% 3)	52/54(%97)
Ampisilin/Sülbaktam	-	-	104/104(%100)
Piperasilin/Tazobaktam	4/102(%4)	4/102(%4)	94/102(%92)
Tikarsilin/Klavulanat	-	-	52/52(%100)
Sefazolin	-	-	104/104(%100)
Sefuroksim	-	-	52/52(%100)
Sefoksitin	10/99(%10,1)	26/99(%26,2)	63/99(64,7)
Seftazidim	5/102(%4,9)	2/102(%1,9)	95/102(93,2)
Seftriakson	2/99(%2)	3/99(%3)	94/99(%95)
Sefoperazon/sülbaktam	1/92(%1)	2/92(%2)	89/92(%97)
Sefepim	18/99(%18)	6/99(%6)	75/99(%76)
Aztreonam	14/104(%13,5)	-	90/104(%86,5)
Gentamisin	56/102(%55)	2/102(%2)	44/102(%43)
Amikasin	52/102 (%51)	40/102(%39)	10/102(%10)
Siprofloksasin	40/94(%42,5)	2/94(%2)	52/94(%55,5)
Norfloksasin	14/41(%34)	3/41(%7)	24/41(%59)
Levofloksasin	21/52(%40)	1/52(%2)	30/52(%58)
Nitrofurantoin	8/46(%17)	4/46(%9)	34/46(%74)
Trimetoprim/Sülfametoksazol	31/102(%30)	-	71/102(%70)

Karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri gösteren izolatların Phoenix otomatize sistem sonuçlarına göre tigesiklin MİK değerleri 8/52'sinde (%15) ≤ 1 , 40/52'sinde (%77) 2, 4/52'sinde (%8) 4, kolistin MİK değerleri ise 47/52'sinde (%90,3) ≤ 1 , 5/52'sinde (%9,7) >4 mg/L saptanmıştır.

Ayrıca KÜE taraması için 1 mg/L imipenem içeren EMB agar besiyerinde kültürü yapılan 210 farklı hastadan alınan rektal sürüntü örneğinden gram negatif bakteri olarak 39'unda (%18,5) sadece *Acinetobacter* spp., 18'inde (%8,5) sadece *Klebsiella* spp., 15'inde (%7) sadece *Pseudomonas* spp., 1'inde (%0,4) sadece *Stenotrophomonas maltophilia*, 2'sinde (%1) *Acinetobacter* spp. ile birlikte *Pseudomonas* spp., 3'ünde (%1,5) *Acinetobacter* spp. ile birlikte *Klebsiella* spp., 1'inde (%0,5) *Stenotrophomonas maltophilia* ile birlikte *Klebsiella* sp. izole edilmiştir.

Rektal sürüntü alınan hastaların 45'i (%21,5) dahiliye yoğun bakım, 30'u (%14) pediatri yoğun bakım, 25'i (%12) beyin cerrahi yoğun bakım, 24'ü (%11,5)

genel cerrahi yoğun bakım, 20'si (%9,5) anestezi yoğun bakım, 18'i (%8,5) genel cerrahi servisi, 11'i (%5) nöroloji yoğun bakım, 10'u (%5) pediatri servisi ve kalan 27'si (%13) diğer servislerdendi.

Rektal sürüntü örneklerinden izole edilen 18 adet *Klebsiella* suşunun 2'si meropenem Etest yöntemiyle duyarlı bulunmuştur. Diğer 16 izolatın disk difüzyon yöntemiyle 9'u orta derece duyarlı, 7'si dirençli, Etest yöntemiyle de 10'u orta derece duyarlı, 6'sı dirençli bulunmuştur.

Kombine diskler ile fenotipik test yapılan 16 izolattan karbapenem direnç mekanizması olarak 11'inde OXA-48 ve benzeri profil, 3'ünde "KPC+MBL", 2'sinde MBL saptanmıştır. Karbapenem direnci saptanan 16 izolattan 2'si MHT negatif bulunurken, 14'ü MHT pozitif bulunmuştur. İzolatların 10'u yenidoğan yoğun bakım, 1'i yenidoğan servis, 1'i kemik iliği transplantasyon ünitesi, 1'i anestezi yoğun bakım, 1'i nöroloji yoğun bakım, 1'i dahiliye yoğun bakım, 1'i de çocuk cerrahi servisinde yatan hastaların örneklerinde üretilmiştir.

Sonuç olarak rektal sürüntü örnekleri KÜE varlığı yönünden taranan 210 servis hastasından 16'sında (%7,5) karbapenem duyarlılığı azalmış *Klebsiella* spp. izole edilmiş, karbapenem direnç mekanizması olarak 11'inde (%5) OXA-48 ve benzeri profil, 3'ünde (%1,5) "KPC+MBL", 2'sinde (%1) MBL saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'nin hızlı yayılımı çoğu hastane ve toplum kökenli enfeksiyonun tedavisi ve kontrolü açısından dünya çapında önemli bir sorundur (140). Enfekte hastaların ve taşıyıcıların tespit edilmesi, yayılımı önlemenin temel koşuludur. Fenotipik ve moleküler yöntemler karbapenemaz üreticilerini tespit edebilir. Taşıyıcıların saptanması ise hala çoğunlukla tarama kültürü besiyeri kullanımına dayanır.

Klinik örneklerde KÜE saptanması ilk olarak otomatize sistem veya disk difüzyon testleriyle elde edilen duyarlılık sonuçlarının dikkatlice analizine dayanır. Otomatize sistemler bütün tip karbapenemaz üreticilerini güvenilir şekilde saptamayabilir ve tutarsızlıklar ortaya çıkabilir (6). Bir çalışmada *broth* mikrodilüsyon yoluyla imipeneme orta derece duyarlı veya dirençli olan 15 *blaKPC*-pozitif *Klebsiella pneumoniae* suşundan MicroScan otomatize sistemi ile 1 (%6,7), Phoenix ile 2 (%13,4), VITEK ile 10 (%67), VITEK 2 ile 5 (%33) ve Sensititre ile 13 (%87) suş imipeneme duyarlı bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada 1 adet suş disk difüzyon yöntemiyle de imipeneme duyarlı bulunmuştur (141). Başka bir çalışmada ise 39'u karbapenemaz, 16'sı karbapenemaz dışı mekanizmalarla karbapenemlere dirençli olan 55 suş farklı otomatize sistemlerle test edilmiş ve karbapenem direncini Phoenix NMIC/id-76 %100 duyarlılık ve özgüllük ile saptarken, MicroScan NM36 %85 duyarlılık ve %6 özgüllük, MicroScan NBC39 %82 duyarlılık ve %19 özgüllük, Vitek 2 AST-N054 ise %74 duyarlılık, %38 özgüllük ile saptamıştır. Otomatize sistemlerin KPC ve çoğu MBL üreticisini güvenilir şekilde saptadığı, buna karşın OXA-48 üreticilerinin tayininde Phoenix sistemi hariç yetersiz kaldıkları bildirilmektedir (142). Sonuç olarak otomatize sistemlerin *Enterobacteriaceae*'de karbapenem MİK değerlerini tayin etmede güvenilirlik sorunları vardır (143,144).

Bizim çalışmamızda her üç karbapenem için de büyük hata ve küçük hata oranları yüksek olmakla birlikte, çok büyük hataya rastlanmamıştır. Uyumun özellikle imipenemde diğer karbapenemlere göre daha düşük olması dikkat çekmektedir. Bu durum imipenemin etkinliğini diğer karbapenemlere göre daha çabuk kaybetmesine bağlı olabilir. Yine de EUCAST önerileri doğrultusunda karbapenem direnci saptama-

nan izolatlarda bu sonucun doğrulanması mantıklı görünmektedir. Zaten EUCAST de, KÜE'yi sıra dışı direnç fenotiplerinden biri olarak saymakta ve bu fenotiple karşılaşıldığında doğrulama önermektedir (145).

Bizim çalışmamızda test edilen 190 suştan Etest ile tayin edilen MİK değerlerine göre imipenem duyarlılığı %66, meropenem duyarlılığı %65 bulunurken ertapenem duyarlılığı %46'da kalmıştır.

Karbapenemaz genlerinin kesin identifikasyonu için moleküler teknikler altın standarttır. Ancak bu teknikler pahalıdır, eğitilmiş personel gerektirir ve yeni, tanımlanmamış genleri saptayamazlar. Ayrıca karbapenemaz tipinin kesin identifikasyonu hasta tedavisinde ya da salgın önlenmesinde aslında gereksizdir. Bu yüzden moleküler tetkikler daha çok referans laboratuvarlarında kullanılabilir (81).

Karbapenem direnç mekanizması için fenotipik tayin yöntemleri birimlerde kolaylıkla yapılabilecek testlerdir ve çoğunun duyarlılık ve özgüllükleri yüksektir, CLSI ve EUCAST tarafından antibiyotik duyarlılık kategorizasyonu için gerekli bulunmasalar da epidemiyolojik araştırmalar ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınmasında faydalı testlerdir (20, 78, 81).

CLSI, karbapenemaz üretiminin doğrulama testi olarak MHT yapılmasını önermektedir. CLSI'ya göre MHT'nin KPC saptamada duyarlılığı ve özgüllüğü %90'ın üstündedir. Giske ve ark.'nın (112) 25 MBL, 34 KPC, 9 OXA-48 üreticisi ve 9 "GSBL+Porin kaybı" ve 9 "AmpC+Porin kaybı" mekanizması ile karbapenem dirençli suş üzerinde yaptığı çalışmada MHT duyarlılığı %100, özgüllüğü %78 bulunmuştur. 4 "AmpC+Porin kaybı" mekanizmalı suşta MHT pozitif saptanmıştır, bu suşların tamamı *Enterobacter* türüdür ve bu suşlardaki MHT pozitifliğinin nedeni bilinmemektedir.

Birgy ve ark. (146) ise 9 MBL, 7 KPC, 6 OXA-48 ve 8 karbapenemlere azalmış permeabilite gösteren GSBL veya AmpC pozitif suş üzerinde yaptıkları çalışmada MHT duyarlılığını %95 saptamışlardır. Bu çalışmada MHT, 1 adet NDM-1 üreticisi suşu saptayamazken, 2 adet AmpC pozitif *Enterobacter* suşunda da yanlış pozitif sonuç vermiştir.

Ambretti ve ark. (147) ise 50 KPC, 20 MBL, 10 AmpC ve 28 GSBL üretici suş üzerinde yaptıkları çalışmada MHT'de %87 duyarlılık, %70 özgüllük saptamışlardır. 100 mg/ml ZnSO₄ ilave edilmiş MH agarda yapılan MHT testinde 6 adet daha

MBL üreticisi saptanmış, böylece duyarlılık %96'ya yükselirken, özgüllük değişmemiştir.

Bizim çalışmamızda ise kombine disk yöntemleri ile yapılan karbapenem direnç mekanizması tayin testlerine göre MHT'nin duyarlılığı %91,2, özgüllüğü ise %81,5 bulunmuştur.

Alışkan ve ark. (148) Temmuz 2009-Mart 2011 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemaz üretimi şüpheli 952 adet *Enterobacteriaceae* izolatından 13'ünde (% 1,4) MHT pozitifliği saptamışlardır. Yarı otomatize sistem kitleri kullanılarak izolatların 8'i (%62) *K. pneumoniae*, 2'si (%15) *E. coli*, 2'si (%15) *Enterobacter aerogenes*, 1'i (% 8) *Klebsiella oxytoca* olarak tanımlanmıştır. MHT pozitif bulunan suşların ikisi (*E. aerogenes*, *E. coli*) imipenem ve meropenem disk difüzyon yöntemi ile duyarlı bulunmuştur. Diğer izolatlarda en az bir karbapenem direnci saptanmıştır.

EUCAST, düşük duyarlılık ve özgüllük oranları ve yorumlama güçlüğü nedeniyle MHT testini önermemektedir, bunun yerine olası karbapenem direnç mekanizmalarının karbapenemaz ve AmpC inhibitörleri kullanılarak kombine disk yöntemleriyle tayinini önermiştir (78). Ancak şu an için OXA-48 tayininde kullanılacak bir inhibitör ve test olmadığından (146, 149) boronik asit, kloksasilin, EDTA ve DPA gibi diğer inhibisyon testleri ile negatif saptanan izolatlardan temosilin MİK değeri >32 mg/L olanların, temosilin kullanılmıyorsa da piperasilin/tazobaktam MİK değeri >32 mg/L olanların OXA-48 üretimi açısından şüpheli kabul edilmeleri önerilmiştir (78).

Fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri yüksektir. EUCAST'ın referans olarak verdiği çalışmada APBA pozitif-kloksasilin negatif fenotipin KPC'yi %100 duyarlılık ve %98 özgüllükle saptadığı, APBA pozitif-kloksasilin pozitif fenotipin "AmpC+Porin kaybı" mekanizmasını % 80 duyarlılık, %100 özgüllükle saptadığı, EDTA pozitif fenotipin MBL üretimini %100 duyarlılık ve %88 özgüllükle ve DPA pozitif fenotipin MBL üretimini %100 duyarlılık ve özgüllükle saptadığı bulunmuştur (112).

Ayrıca olası karbapenem direnç mekanizmalarının karbapenemaz ve AmpC inhibitörleri kullanılarak sinerji testleriyle tayini için ticari kombine disk (Rosco Synergy Test; Rosco Diagnostica) üretilmektedir. Meropenem 10 µg, meropenem 10

μg +boronik asit, meropenem 10 μg +kloksasilin ve meropenem 10 μg +DPA içeren bu disklerin Ambretti ve ark. (147) çalışmasında KPC için duyarlılık ve özgüllüğü %100, MBL için duyarlılığı %100, özgüllüğü %98, AmpC tayini için de duyarlılığı %60, özgüllüğü %100 bulunmuştur. Giske ve ark. (112) çalışmasında ise bu ticari disklerin KPC için duyarlılığı %100, özgüllüğü %98, MBL için duyarlılığı %100, özgüllüğü %98 ve AmpC için duyarlılığı %40 özgüllüğü, %100 bulunmuştur.

Ayrıca KPC ve MBL'nin fenotipik tayini için ticari kombine Etest (bioMerieux, La Balme-les-Grottes, Fransa) şeritleri üretilmektedir. MBL tayini için IP/IPI şeridi imipenem (4–256 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/imipenem (1–64 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+EDTA içermekte, MP/MPI şeridi meropenem (0.125–8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/meropenem (0.032–2 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+EDTA içermekte, KPC tayini için üretilen MP/MPB şeridi ise meropenem (0.25–16 $\mu\text{g}/\text{ml}$)/meropenem (0.064–4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)+boronik asit içermektedir. Şeritlerin iki tarafındaki MİK değerleri arasında >3 katlık farkın üretici firma tarafından, KPC veya MBL varlığı açısından pozitif kabul edilmesi önerilmiştir. Girlich ve ark. (139) çalışmasında IP/IPI sribinin duyarlılığı %81,5, özgüllüğü %100, MP/MPI sribinin duyarlılığı %94,4, özgüllüğü %97, MP/MPB sribinin ise duyarlılığı %91,7, özgüllüğü %100 bulunmuştur.

Çalışmamızda karbapenemlerden en az birine artmış MİK değeri saptanan 104 izolattan 59'unda %56,5'lik oran ile en sık saptanan direnç profili OXA şüpheli profildir. Bu sonuç Perçin ve ark.'nın (150) “Rektal Sürüntü Örneklerinde Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Taranmasında Klasik Yöntemlerle Ertapenemli EMB Besiyerinin Karşılaştırılması” adlı çalışmasındaki sonuç ile örtüşmektedir. Bu çalışmada da rektal sürüntü kültürlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında en sık karşılaşılan karbapenemaz tipi OXA olmuştur. Bush sınıflamasına göre alt grup 2de'de yer alan OXA enzimleri, sıklıkla Türkiye ve Fransa'daki *P. aeruginosa* izolatlarında bulunur ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz ederken, alt grup 2df'de yer alan OXA enzimleri en sık olarak *Acinetobacter baumannii*'de bulunur, genellikle kromozomda yer alan genler tarafından üretilir ve karbapenemleri hidrolize ederler (54). Ancak bu son grupta yer alan OXA-48 enzimi ilk kez 2001'de Türkiye'de bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır ve plazmitçe kodlanır (62).

Bizim çalışmamızda da KÜE taraması için 1 mg/L imipenem içeren EMB agar besiyerinde kültürü yapılan rektal sürüntü örneklerinin kültüründe *Klebsiella* spp. ile birlikte en sık üreyen bakterilerin *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. olması da, *Klebsiella* izolatlarındaki OXA genlerinin *Acinetobacter* spp. ve *Pseudomonas* spp. kökenli olabileceğini düşündürmektedir.

Klinik örneklerden izole edilen her karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* suşunda, MHT ya da kombine diskler kullanılarak direnç mekanizmasının belirlenmesi gerekli değildir. Ancak direnç görülme sıklığının arttığı birimlerde belirlenmesi, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için uyarıcı olabilir. Çünkü karbapenem direncinin esas nedeni, genetik olarak aktarılabilir karbapenemaz genleridir (KPC, MBL, OXA). Hastanemizde bu yayılımın önlenmesi için vankomisin dirençli enterokok yayılımının kontrolünde olduğu gibi, bir sürveyans ve taşıyıcı ve/veya hasta izolasyonu prosedürü yerleştirilebilir. Ayrıca kombine diskler kullanılarak karbapenem direnç mekanizmasının belirlenmesi epidemiyolojik bilgi elde edilmesi açısından da faydalıdır. MHT ise özgülüğünün düşük olması nedeniyle önerilmemektedir.

KÜE ile ilgili akla gelen bir soru, enfeksiyonlarının nasıl tedavi edileceğidir. Enfeksiyon etkeninin duyarlılığı uygun antimikrobiyal tedaviye karar vermede anahtar faktörlerden biridir. Dünya çapında birçok çalışmadan elde edilen *in vitro* duyarlılık verilerine göre kolistin, tigesiklin ve fosfomisin hem KPC, hem MBL üreten klinik *Enterobacteriaceae* suşlarına en etkili antibakteriyellerdir. Ancak ilaç etkinlikleri dirençli izolatların birimlerde yayılım derecesine göre değişir ve bu ilaçların aktiviteleri de hızla azalmaktadır (151-153). KÜE'nin çoklu ilaç dirençli doğasının sonucu olarak florokinolon duyarlılık oranları da genelde düşüktür.

Bizim çalışmamızda karbapenem dirençli suşlar arasında Phoenix otomatize sistemi sonuçlarına göre siprofloksasin duyarlılık oranları 40/94 (%42,5) bulunurken, levofloksasin duyarlılık oranı 21/52 (%40) bulunmuştur.

Nitrofurantoin ve kloramfenikol gibi daha az klinik öneme sahip antimikrobiyallerde de duyarlılık oranları düşük bulunmuştur. Şu an kullanılan aminoglikozidler arasında şimdiye kadar sadece gentamisin KPC üreticilerine ve VIM tipi edinsel MBL'lere karşı iyi aktivite göstermiştir (83). Ancak NDM üreticile-

rinin çoğu 16S ribozomal RNA metilaz ortak üretimine bağlı olarak eldeki tüm klinik aminoglikozidlere dirençlidir (154).

Bizim çalışmamızda karbabenem dirençli suşlar arasında Phoenix otomatize sistemi sonuçlarına göre gentamisin duyarlılık oranı 56/102 (%55) bulunurken, amikasin duyarlılık oranı 52/102 (%51) bulunmuştur.

Beta-laktamlar arasında KÜE'ye karşı en etkili bileşiklerin yine karbapenemler olması ilk bakışta çelişki gibi görünebilir, ancak CLSI ve EUCAST tarafından farklı sınır değer uygulamalarının olduğu dikkate alınmalıdır. Yunan hastanelerinde esas olarak KPC-2 üreten *K. pneumoniae* suşlarından oluşan bakteriyel bir popülasyonun %10-15'inin CLSI kriterleri ile dirençliyken EUCAST kriterleri ile duyarlı olduğu saptanmıştır (83).

Aztreonam edinsel MBL'lerle hidrolize dayanıklı olsa da sıklıkla CTX-M veya SHV tipi GSBL'lerin de ortak üretiminden dolayı kısıtlı aktivite göstermektedir (155). Bizim çalışmamızda da karbabenem dirençli suşlar arasında Phoenix otomatize sistemi sonuçlarına göre aztreonam duyarlılık oranları %13,5 (14/104)'te kalmıştır.

Son olarak tikarsilinin 6-alfa-metoksi türevi olan temosilin, KPC üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli*'ye makul aktivite gösteriyor gibi görünmektedir ancak bu konudaki bilgi kısıtlıdır (83).

Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde seçenekler kısıtlı olduğu için farklı antimikrobiyal ajan kombinasyonlarının bu organizmalara karşı potansiyel sinerjistik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalarda en sık kullanılan bileşikler polimiksin B ve polimiksin E (kolistin)'dir.

Bir çalışmada KPC pozitif *K. pneumoniae* izolatları üzerinde polimiksin B'nin imipenem ile 10/16, rifampin ile 15/16 oranında sinerjistik olduğu gösterilmiştir (156). Başka bir çalışmada polimiksin B-doripenem-rifampin üçlü kombinasyonunun KPC pozitif izolatlara karşı yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (157). Ayrıca kolistin ve tigesiklinin de KPC pozitif *K. pneumoniae* izolatlarına karşı yüksek bakterisidal aktivite gösterdiği bulunmuştur (158). VIM pozitif *K. pneumoniae* izolatları üzerinde yapılan başka bir çalışmada da imipenem-kolistin kombinasyonu artmış bakterisidal aktivite göstermiş, ancak sinerji sadece kolistine duyarlı veya düşük düzey direnç gösteren izolatlarda gözlenmiştir (159). KPC üreten

K. pneumoniae izolatları üzerinde yapılan bir çalışmanın sonucuna göre ise polimiksin B-rifampin, polimiksin B-doksisisiklin ve polimiksin B-tigesiklin kombinasyonlarının tedavide faydalı olabileceği önerilirken, polimiksin B-imipenem ve polimiksin B-gentamisin kombinasyonlarında ise sinerji gözlenmemiştir (160).

Fosfomisin, çoğu KÜE'ye karşı aktivitesini koruduğundan bu enfeksiyonlarda kullanılması mantıklıdır ancak fosfomisin direncine sebep olan mutasyon oranı yüksek olduğu için daima başka bir antimikrobiyal ajan ile kombine kullanılmalıdır (161). KPC pozitif *K. pneumoniae* izolatları üzerinde yapılan bir çalışmada, fosfomisin meropenem ile %64,7, kolistin ile %11,8 oranda sinerjistik bulunurken, gentamisin ile sinerjistik bulunmamıştır (162).

KPC veya MBL üreten *K. pneumoniae* enfeksiyonunun görüldüğü 298 hastanın tedavi protokolleri ve başarı oranlarının incelendiği çalışmada, en yüksek başarı oranı, biri karbapenem olan iki *in vitro* aktif ilaçtan oluşan kombinasyon terapisi alan hastalarda, en düşük başarı oranı ise *in vitro* aktif olmayan ilaç terapisi alan hastalarda görülmüştür. Tek başına aminoglikozid veya karbapenem tedavisi ve karbapenemden farklı iki *in vitro* aktif ilaçtan oluşan kombinasyon tedavilerinde de başarı oranı, *in vitro* aktif olmayan ilaç terapisi alan hastalarda görülen başarı oranlarından daha yüksek bulunmuş, tek başına tigesiklin veya kolistin tedavilerindeki başarı oranı ise *in vitro* aktif olmayan ilaç terapisi alan hastalarda görülen başarı oranlarına yakın bulunmuştur. Bu gözlemler, ciddi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde tek başına kolistin veya tigesiklin kullanımı hakkındaki şüpheleri arttırmakta ve duyarlılık durumu uygun olduğunda tercihen bir karbapenem içeren kombinasyon terapilerinin uygulanması görüşünü desteklemektedir (83).

FDA ciddi enfeksiyonlarda tigesiklin kullanımı hakkında uyarıda bulunmuştur. FDA analizinde ağır enfeksiyonların tedavisi için tigesiklin kullanılan hastalarda yüksek mortalite oranları saptanmıştır (163). Başka bir çalışmada da tigesiklin kullanılan hastalardaki mortalite oranları levofloksasin, karbapenem, seftriakson ve ampisilin/sulbaktam kullanılan hastalardakine göre daha yüksek bulunmuştur (164).

Ağır enfeksiyonlarda tigesiklinin düşük klinik etkinliği kısmen ilacın farmakokinetik/farmakodinamik profiliyle alakalı olabilir. Tigesiklin esas olarak gram negatif organizmalara karşı bakteriyostatik aktivite gösterir ve ilacın birçok anatomik bölgede ulaşabildiği konsantrasyon optimalin altındadır. Bu nedenle bu ilaç

KÜE enfeksiyonlarının tedavisinde dikkatle, tercihen başka bir aktif ajanla kombine halde kullanılmalıdır (83).

KÜE enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin monoterapisinin de performansı düşüktür (165). Ancak kolistin bir aminoglikozid veya tigesiklin ile kombine edildiği zaman başarısızlık oranı %47,2'den %32'ye düşmüştür, karbapenem ile kombine edildiği zaman ise çarpıcı olarak %5'e kadar gerilemiştir (83). Kolistinin yetersiz etkinliği ilacın optimal dozdan düşük bir rejimle kullanılması ile ilgili olabilir (166). Hasta sonucunu olumsuz etkileyebilecek bir başka faktör, standart kolistin tedavi rejimi ile etkili ilaç konsantrasyonuna ulaşmada gecikme olabilmesidir, bu da yüklem dozunu uygulanmasıyla önlenemez (167). Kolistin, çoklu ilaç dirençli gram negatif organizmalarla enfekte kritik hastalarda yaygın olarak kullanılmasına rağmen optimal doz rejimi hala tanımsızdır. Ayrıca kolistinin nefrotoksik ve nörotoksik etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır (83,168).

Bizim çalışmamızda Phoenix otomatize sistemi ile saptanan kolistin MİK değerleri, EUCAST sınır değerlerine göre genellikle duyarlı, tigesiklin MİK değerleri ise EUCAST sınır değerlerine göre genellikle orta derece duyarlı olarak kategorize edilmektedir. Bununla birlikte kolistin ve tigesiklin için CLSI MİK değerleri tanımlanmamıştır (20,106).

Karbapenemaz üretimi varlığında karbapenemlerin kullanılıp kullanılmayacağı hala cevaplanması gereken bir konudur. Ancak MİK değeri ≤ 4 ve hatta ≤ 8 $\mu\text{g/ml}$ olan bir organizmaya karşı yüksek doz veya uzun süreli infüzyon ile ve başka bir aktif ajanla (tercihen gentamisin veya kolistin) kombine olarak karbapenem kullanımı mantıklı görünmektedir. Karbapenem monoterapisi ile ilgili klinik tecrübe kısıtlıdır. Karbapenemaz pozitif *K. pneumoniae* ile enfekte ve karbapenem monoterapisi alan 50 hasta üzerinde yapılan analizde tedavi etkinliği, karbapenem MİK değeri >8 mg/L olan izolatlarda %25 bulunmuşken, 8 mg/L olan izolatlarda %66,7'ye, 4 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlarda %71,4'e, ≤ 2 $\mu\text{g/ml}$ olan izolatlarda ise %72,4'e yükselmiştir. Bu bilgi karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'nin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde suş karbapenemlere orta derece duyarlı bile olsa karbapenemlerin terapötik faydalar sağlayabileceğini göstermektedir (83). Karbapenem MİK veya zon çapı değerlerine göre orta derece duyarlı görünen organizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde seçeneklerin kısıtlı olmasından

dolayı, klinisyenler önerilen maksimum karbapenem dozlarını kullanmak ve muhtemelen intravenöz infüzyon süresini uzatmak isteyebilirler (20).

Bizim çalışmamızda MBL ürettiği saptanan izolatların tamamında karbapenem MİK değerlerinin 32 mg/L'den büyük bulunması, MBL üreten *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılacak kombinasyonlarda karbapenemlerinin yerinin olmadığını düşündürmüştür.

Hemen hemen eldeki tüm ajanlara direnç gösteren KÜE sayısı endişe verici düzeyde yüksektir. Fosfomisin *in vitro* olarak çoğu KÜE'ye karşı aktif olduğu göz önüne alınırsa, tedavi seçeneklerinin çok kısıtlı olduğu durumlarda seçilebilir. Fosfomisin esas endikasyonu hala alt üriner sistem enfeksiyonları olmasına rağmen, bazı araştırmacılar bu ilacı KÜE'nin sebep olduğu sistemik enfeksiyonların tedavisinde farklı kombinasyon şemalarına eklemiştir (169-171).

KÜE'ye karşı klinik test aşamasında yeni ajanlar, sülfaktamlar, plazomisin, amino-açıl taşıyıcı RNA sentetaz inhibitörleridir. Karbapenemaz inhibitörleri ise, 1-beta-metilkarbapenemler, sülfonlar, süksinik asitler, tioller ve avibaktamdır (83).

Akla gelen diğer bir soru, KÜE yayılımının ve enfeksiyonlarının nasıl önleneceğidir.

Günümüzde KÜE enfeksiyonları, çoğunlukla karbapenemaz genlerinin kazanılmasının sonucu olarak dünya çapında raporlanmaktadır. Endemik alanlarda KÜE prevalansı %20-40 arasında değişebilmektedir. KÜE başlangıçta esas olarak yoğun bakım ünitesi hastalarında hastane kökenli enfeksiyonlara sebep olmuşken sonradan farklı sağlık birimlerine yayılmıştır (6,83).

Mayıs 2010-Mayıs 2013 tarihleri arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına gelen klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında ertapenem, meropenem ve imipenem duyarlılığı %90'ın üzerinde bulunmuştur.

Meropenem duyarlılık oranlarının belirlendiği global bir çalışma olan MYSTIC'te, 2000-2003 yılları arasında Türkiye'de dokuz merkezden elde edilen verilere göre *Enterobacteriaceae* izolatlarında duyarlılık oranları meropenem için %99,3, imipenem için ise %97,6 olarak bulunmuştur (172).

Akın ve ark.'nın (173) Ocak 2004-Aralık 2008 tarihleri arasında anestezi yoğun bakım hastalarından izole edilen organizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının

araştırıldığı çalışmasında, imipenem direnç oranı; 2004'te *E. coli* izolatlarında %1, *K. pneumoniae* izolatlarında %3, 2005'te *E. coli* izolatlarında %0, *K. pneumoniae* izolatlarında %4, 2006'da *E. coli* izolatlarında %0, *K. pneumoniae* izolatlarında %3, 2007'de *E. coli* izolatlarında %3,3, *K. pneumoniae* suşunda izolatlarında %3,3, 2008'de *E. coli* izolatlarında %2,2, *K. pneumoniae* izolatlarında %2,1 bulunmuştur. Meropeneme ise sadece 2007'de her iki cinste de %3,3 oranında dirence rastlanmış, diğer yıllarda meropenem direnci görülmemiştir.

2007 yılında yapılan çok merkezli HİTİT-2 çalışmasının sonuçlarına göre *E. coli* suşlarında karbapenem direnci gözlenmezken, *K. pneumoniae* suşlarında imipenem direnci %3,2 olarak belirlenmiştir (174).

Kuzucu ve ark.'nın (175) çalışmasına göre Ocak 2007-Şubat 2008 tarihleri arasında izole edilen 239'u *E.coli*, 28'i *K. pneumoniae* ve 11'i *Klebsiella oxytoca*, toplam 278 GSBL pozitif suşta imipenem/meropenem duyarlılığı %99,3 (276/278), ertapenem duyarlılığı %98,6 (274/278) olarak saptanmıştır. *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* suşları ayrı ayrı değerlendirildiğinde; ertapenem duyarlılığı sırasıyla %99,2, %96,4 ve %90,9, imipenem/meropenem duyarlılığı ise sırasıyla %100, %96,4 ve %90,9 olarak saptanmıştır.

EARRS-2008 çalışması ise Türkiye'de karbapenem direncinin %1-5 arasında olduğunu bildirmiştir (176).

Duman ve ark. (177) 2009 yılı içerisinde kan dolaşım enfeksiyonlarından izole edilen 119 *E. coli* ve 39 *Klebsiella* sp. izolatının tamamını imipenem ve meropeneme duyarlı saptamışlardır.

Tekin ve ark.'nın (178) çalışmasına göre Aralık 2010-Ağustos 2011 tarihlerinde Dicle Üniversitesi Hastanesi klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen 334 *E. coli* suşunda ertapeneme duyarlılık oranı %93,4 olarak tespit edilmiştir.

Çıkman ve ark.'nın (179) çalışmasında Haziran 2011-Şubat 2012 tarihleri arasında yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 13 *Klebsiella* suşundan 12'si (%92) ve 10 *E. coli* suşundan 10'u (%100) imipeneme duyarlı bulunmuştur.

Tüm bu çalışmaların ışığında Türkiye'de *Enterobacteriaceae* suşlarında karbapenem dirençlerinin halen yüksek olmadığı söylenebilir.

Enterobacteriaceae üyeleri insan bağırsak florası bileşeni olduklarından KÜE bir kez bağırsağı kolonize ettiğinde, taşıyıcılık uzun süre devam edebilir. KÜE ile kolonizasyon uzun sürelidir ve en az birkaç ayda sonlanır. Uzun süreli kolonizasyonda hastadan hastaya aktarım oranları artar. Enfeksiyon kontrol önlemlerinin zayıf olduğu birimlerde bu aktarım daha etkilidir. El hijyeni uyumunun %21 olduğu bir cerrahi birimde, bir hastanın KÜE ile kolonize olma ihtimali hastanede yatış süresince hafta başına %7,1 olduğu bulunmuştur. Bir sağlık biriminde ilk KÜE enfeksiyonu tanısı konduğunda bu organizmalar çoktan genişçe yayılım göstermiş ve önemli sayıda hastayı kolonize etmiş olabilirler. Kolonizasyon yaygın olabilir ve bu, endemik bölgelerde yer alan birimlerde fark edilmeyebilir. Daha da önemlisi KÜE kolonizasyonu enfeksiyona ilerleyebilir. Enfeksiyon/kolonizasyon oranı hakkında kısıtlı bilgi olmasına rağmen, kolonize hastaların %10-30'unda enfeksiyon geliştiği söylenebilir. Bu yüzdeler kısmen muhtemelen altta yatan hastalığın ciddiyetiyle ilişkilidir ve ağır immün yetmezliği olan hastalarda daha yüksektir (83). İsrail'den araştırmacılar, konaktaki zayıf fonksiyonel durum, önceden antibiyotik tedavisi alımı ve yoğun bakım ünitesinde kalışın karbapenem dirençli *K. pneumoniae* kolonizasyonu veya enfeksiyonu için bağımsız risk faktörü olduğunu göstermişlerdir. KÜE enfeksiyonu riskini arttıran diğer faktörler; solid organ veya kök hücre transplantasyonu, biliyer kateter varlığı, multipl invaziv araç, cerrahi ve yara varlığıdır (83,180). Seçici antibiyotik baskısı da bu organizmalarla kolonizasyonu etkileyen bir faktör olabilir. Vaka-kontrol çalışmaları hemen her antibiyotik kullanımının KÜE seçilimine sebep olabileceğini göstermiştir. Spesifik antibiyotik sınıfı kullanımından ziyade önceki antibiyotik maruziyetlerinin kümülatif sayısı daha önemli gibi görünmektedir (181).

KÜE salgınları esas olarak enfeksiyon önlemlerinin yetersiz olduğu birimlerde ortaya çıkar. KÜE'nin, bir sağlık biriminde hastadan hastaya yayılımdan başka, hasta döngüsü sayesinde kurumlar arasında ve/veya yüksek prevalanslı bir ülkeden düşük prevalanslıya doğru sınır ötesi yayılım potansiyeli de yüksektir ve her sağlık sistemini tehdit etmektedir (182).

Bu yüzden KÜE endemik olma fırsatını bulmadan önce bir hazırlık planı oluşturmak zorunludur. Endemik olduğu bölgelerde ise kontrol önlemleri ulusal düzeyde kurumların koordine ettiği çok yönlü yaklaşımı içermelidir. Bu ihtiyaca yönelik olarak *Center for Disease Control and Prevention* (CDC), KÜE aktarımını kont-

rol altına almak için önlemler kılavuzu yayınlamıştır. Bu önlemler esas olarak çoklu ilaç dirençli diğer organizmalarla olan tecrübelerle dayanır ve tayin, izolasyon veya kohort ve diğer arttırılmış enfeksiyon kontrol önlemlerini içerir (183).

Sağlık biriminde KÜE aktarımını kesme başarısı için enfekte ve/veya kolonize hastaların zamanında tanınması kritiktir. Bu nedenle her klinik mikrobiyoloji laboratuvarı güvenilir tayin yöntemi yerleştirmelidir. Ayrıca aktif sürveyans kültürleri ile birlikte, nokta prevalans tayinleri için olanaklar ve eğitimli personel bulunmalıdır (184). Calfe ve ark. (185) karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ile kolonize hastaların %37'sinin ilk defa sürveyans kültürleri ile identifiye edildiğini bildirmiştir.

Sürveyans kültürleri için en uygun anatomik bölgeler perianal bölge ve rektumdur. Cerrahi yaralar, dekübitüs ülserleri, üriner kateter, bronşiyal sekresyonlar da taranabilir.

Tarama için birçok kültür bazlı teknik tanımlanmıştır. Tarama için kullanılan karbapenem konsantrasyonu ile ilgili farklı görüşler vardır, en düşüğü EUCAST tarafından önerilen ve ECOFF değerine dayanan 0,25 µg/ml'lik meropenem konsantrasyonudur (83, 186).

Çalışmamızda kullanılan 1 mg/L'lik imipenem dozu ile 210 rektal sürüntü örneğinde en sık üretilen bakteri *Acinetobacter* spp. olup bunu *Klebsiella* spp. ve *Pseudomonas* spp. takip etti. Ayrıca *Stenotrophomonas maltophilia* üreyen iki hasta da pediatrik yaş grubundadır. KÜE üretilen hastaların çoğunun yenidoğan yoğun bakım hastası olması, immün sistem gelişimi tamamlanmadan KÜE'nin kolayca kolonize edebildiğini düşündürmüştür. Bu yüzden yenidoğan yoğun bakım birimindeki personelin ve önlemlerin titiz olması gerekir.

Perçin ve ark. (150) da 2 mg/L ertapenem içeren EMB agar besiyerini kullanarak 801 hastanın rektal sürüntü örneğinden 33 suş izole etmişler, 13 (%39.4)'ünde PCR ile herhangi bir direnç geni saptanamazken, 20 pozitif suşun 19 (%95)'unda *blaOXA-48*, 1 (%5)'inde ise *blaIMP* saptamışlardır. PCR sonuçlarına göre yöntemin duyarlılığı %80 olarak tespit edilmiştir.

Ayrıca aktif sürveyans için birçok PCR bazlı teknik tanımlanmıştır. PCR yöntemleri hızlı ve genellikle kültür-bazlı yöntemlerden daha duyarlıdır. Ancak asıl de-

zavantajları karbapenemaz üreten türler üzerinde bilgi vermemeleri ve sadece bilinen direnç genlerini belirleyebilmeleridir (125).

Düşük KÜE prevalansı olan bölgelerde laboratuvarlar klinik kültür sonuçlarını KÜE izolasyonu açısından takip etmelidir. Eğer bir klinik kültürde KÜE tanımlanırsa belirli birimlerde nokta prevalans çalışması yapılmalıdır. Taşıyıcı tayinini, KÜE izole edilen kişilerle potansiyel epidemiyolojik bağlantısı olan daha geniş bir hasta kesimini kapsayan (aynı birim hastaları ve aynı sağlık çalışanlarının ilgilendiği hastalar) aktif sürveyans izlemelidir. Hiç yeni KÜE olgusu tanımlanmayana kadar aktif sürveyans devam etmelidir.

KÜE taşıyıcılığı riskinin yüksek olduğu bir hasta (uzun dönem bakım ünitesinde kalma, yoğun bakım ünitesinde yatma, önceki 6 ay içinde uzun süreli hospitalizasyon ya da kalıcı cihaz) birime kabul edilirken sürveyans kültür sonuçlarının beklenmesi sırasında izolasyon, erken KÜE aktarımlarını önler. Bir hasta tekrar topluma ya da uzun dönem bakım ünitesine dönerken sürveyans kültürü uygulamak da KÜE aktarımını önlemede faydalı olabilir.

Sürveyans stratejisi her birim için açıkça tanımlanmalı ve mevcut durum ve imkanlar dahilinde periyodik olarak değerlendirilmelidir. Bir KÜE taşıyıcısı saptandığı zaman enfeksiyon kontrol personeline hemen bildirilmelidir. Taşıyıcıların kohortu ve izolasyonu esas koruyucu önlem olarak görünmektedir (83, 183).

Özel sağlık çalışanlarının atanması ve taşıyıcılar için kullanılan malzemelerin ayrılması birçok salgında başarı ile kullanılmış ilave müdahalelerdir. İzolasyona ilave olarak akut sağlık birimlerinde çalışan personel, KÜE taşıyıcı veya enfeksiyonlu hastayla ilgilenirken temas önlemleri (eldiven, önlük) almalıdır (183,187,188). Uzun dönem bakım birimlerinde ise sadece ağır hasta ve bulaşmaya imkan tanıyan koşulları olan (diyare, dekübitüs ülseri) hastalar için temas önlemlerinin uygulanması pratiktir (189).

İsrail’de ülke çapında görülen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* salgınının ulusal düzeyde müdahalelerle kontrol altına alınmasında en önemli bileşenler taşıyıcılarla taşıyıcı olmayanların fiziksel olarak ayrılması ve taşıyıcıların bakımı için özel personel sağlanmasıydı (188).

ABD'de son iki salgını başarıyla kontrol altına alan önlemler arasında hastaların cildini günlük antiseptik banyolarıyla temizlemekle birlikte, KÜE taşıyıcısına yakın cansız çevre ve ekipmanların da temizlenmesi vardır (184,190).

Aslında *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ile persistan çevresel kontaminasyon diğer organizmalara kıyasla kısıtlıdır (191). Cansız çevre ve paylaşılan ekipmanların bir salgınla potansiyel ilişkisi kurulmadıkça, bulaşma zincirindeki rollerini araştırmak için yüzey ve ekipman kültürü genellikle gereksizdir (192). Diğer taraftan günlük antiseptik banyolarının damar kateteri ilişkili kan akımı enfeksiyonlarını önlemede etkinliği kanıtlanmıştır (193).

Kemoterapi ve kök hücre transplantı alan hastalarda oral gentamisin ile bağırsağın selektif dekolonizasyonu KÜE taşıyıcılığının eradikasyonunda %66 oranında etkilidir (194).

KÜE'nin kontrol altına alınmasında antibiyotik kısıtlamasının rolü hakkında daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır. Ancak hemen her sınıf antibiyotik KÜE seçilimine sebep olabilir, bu bağlamda kümülatif antibiyotik maruziyeti spesifik bir ajanla seçimden muhtemelen daha önemlidir. Bu yüzden önlemler genel antibiyotik kullanımının azalmasına odaklanmalıdır (195).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mayıs 2010-Mayıs 2013 tarihleri arasında ESOGÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına gelen klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında imipenem, ertapenem ve meropenem için duyarlılık oranları %90'dan fazla olmakla birlikte bazı suşlarda artmış MİK değerlerine rastlanabilmektedir. Bu çalışmada Phoenix otomatize sistemi ile elde edilen MİK değerleri Etest yöntemi ile doğrulamaya tabi tutulmuş, sonucunda büyük hata ve küçük hata oranlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu yüzden otomatize sistem ile elde edilen sonuçların ikinci bir yöntemle doğrulanması gerekli görünmektedir.

Sağlık biriminde karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* aktarımının durdurulması için enfekte ve/veya kolonize hastaların zamanında tanınması kritiktir. Kombine disk yöntemlerinin kullanıldığı fenotipik testlerin karbapenem direnç profillerini yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptadığı bildirilmiştir. Bu testler birimlerde kolaylıkla yapılabilecek testlerdir ve rutinde uygulanmalarıyla karbapenemaz üretici *Enterobacteriaceae*'nin erken tanısı sağlanabilir ve böylece enfeksiyon kontrol önlemleri de zamanında alınabilir. Bu çalışmada kombine disk yöntemlerinin kullanıldığı fenotipik testlerle olası direnç mekanizmalarından en sık OXA-48 ve benzeri profil saptanmıştır. Ancak kesin sonuçlar için referans yöntemle doğrulama gerekmektedir.

KÜE salgınları esas olarak enfeksiyon önlemlerinin yetersiz olduğu birimlerde ortaya çıktığından dezenfeksiyon ve antisepsi koşullarına dikkatle uyulmalıdır. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının sorun olduğu birimlerde diğer hastane ilişkili enfeksiyonlarda olduğu gibi düzenli bir sürveyans yapıp elde edilen veriler ışığında kontrol politikaları geliştirilmelidir. Bu amaçla karbapenem içeren tarama besiyerleri kullanılabilir. Enfekte ve/veya taşıyıcı olduğu saptanan hastaların izolasyonu esas önlemdir, ayrıca bu hastalara özel sağlık personeli ve ekipman ayrılması da faydalı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology. İç: Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM, editors. Aktepe O. Enterobacteriaceae: Giriş ve tanımlama. 9. Baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.s.649-669.
2. Korzeniewska E, Harnisz M. Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in hospital effluents. *Journal of Environmental Management*. 2013;123:1-7.
3. Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1999;43:447-458.
4. Budak S, Aktaş Z, Erdem H. Enterik gram-negatif bakterilerde laboratuvarından kliniğe karbapenemazlar. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*. 2012;1:1.
5. Overturf GD. Carbapenemases: a brief review for pediatric infectious disease specialists. *Pediatr Infect Dis J*. 2010;29(1):68-70.
6. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(5):432-8.
7. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53(1):60-7.
8. Thomson KS. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010;48:1019-1025.
9. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. St. Louis: Saunders; 2007.
10. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology. İç: Abbott SL, editor. Kaleli İ. Gram-negatif enterik basiller. 9. Baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.s.698-715.

11. Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 2001;5:210-229.
12. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 1997;1:38-45.
13. Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. Bailey&Scott's diagnostic microbiology. 25th ed. St. Louis: Mosby; 2007.
14. Kalant H. The pharmacology of semisynthetic antibiotics. Can Med Assoc J. 1965;93(16):839-843.
15. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology. İç: Yao JDC, Moellering RC, editors. Köksal İ. Antibakteriyel ajanlar. 9. baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitap-çılık; 2009.s.1077-1113.
16. Hauser AR. Antibiotic basics for clinicians: Choosing the right antibacterial agent. 2nd ed. Baltimore: Lippincott Williams &Wilkins; 2013.
17. Norris SM. Penicillins with antipseudomonal activity. Infection Control. 1985;6:165-168.
18. Dancer SJ. The problem with cephalosporins. J Antimicrob Chemother. 2001;48(4):463-478.
19. Brogden RN, McTavish D. Loracarbef. A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs. 1993;45(5):716-36.
20. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 19th informational supplement. CLSI document M100-S22. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
21. Özyurt M, Haznedaroğlu T, Baylan O, Hoşbul T, Ardiç N, Bektöre B. Yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas* izolatlarında antibiyotik direnci. Ankem Derg. 2010;24(3):124-129.

22. Rittenbury MS. How and why aztreonam works. *Surg Gynecol Obstet*. 1990;171:19-23.
23. Nukaga M, Tsukamoto K, Yamaguchi H, Sawai T. Interaction of oxyimino beta-lactams with a class C beta-lactamase and a mutant with a spectrum extended to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1994;38:1374-1377.
24. Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin North Am*. 1997;11(4):875-87.
25. Livermore DM. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 5:21-4.
26. Nunez LE, Mendez C, Brana AF, Blanco G, Salas JA. The biosynthetic gene cluster for the beta-lactam carbapenem thienamycin in *Streptomyces cattleya*. *Chem Biol*. 2003;10(4):301-11.
27. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14:1102-1111.
28. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(11):4943-60.
29. Martinez-Martinez L. Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin Microbiol Infect*. 2008;14 Suppl 1:82-9.
30. Hashizume T, Ishino F, Nakagawa J, Tamaki S, Matsushashi M. Studies on the mechanism of action of imipenem (n-formimidoylthienamycin) in vitro: binding to the penicillin-binding proteins (PBPs) in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, and inhibition of enzyme activities due to the PBPs in *E. coli*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984;37(4):394-400.
31. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem*. 2009;16(5):564-75.
32. Mandell L. Doripenem: a new carbapenem in the treatment of nosocomial infection. *Clin Infect Dis*. 2009;49 Suppl 1:S1-3.
33. Queenan AM, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and inhibition profiles of beta-lactamases from molecular classes A to D with doripenem,

- imipenem, and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):565-9.
34. Hugonnet JE, Tremblay LW, Boshoff HI, Barry CE, Blanchard JS. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2009;323(5918):1215-8.
 35. Ermertcan S, Hoşgör M, Tünger O, Coşar G. Investigation of synergism of meropenem and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* strains isolated from intensive care unit infections. *Scand J Infect Dis.* 2001;33(11):818-21.
 36. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 2006;34(5 Suppl 1):S3-10.
 37. Demirtürk N, Demirdal T. Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi.* 2004;5(2):17-21
 38. Somer A. Antibiyotiklerde direnç sorunu. *Türk Ped Arş.* 2010;45: 80. Yıl:45-9
 39. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2009;48(1):1-12.
 40. Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):178-82.
 41. Woodford N, Ward ME, Kaufmann ME, Turton J, Fagan EJ, James D, Johnson AP, Pike R, Warner M, Cheasty T, Pearson A, Harry S, Leach JB, Loughrey A, Lowes JA, Warren RE, Livermore DM. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2004;54(4):735-43.
 42. McGowan JE. Economic impact of antimicrobial resistance. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(2):286-292.
 43. Kuyucu N. Antibiyotik direnci. *Çocuk Enf Derg.* 2007;1: özel sayı 1;33-8
 44. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001;14(4):933-51.

45. Lupski JR. Molecular mechanisms for transposition of drug-resistance genes and other movable genetic elements. *Rev Infect Dis.* 1987;9(2):357-68.
46. Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase: enzymology and molecular biology. *CRC Crit Rev Biochem.* 1983;14(1):1-46.
47. Wright GD. Aminoglycoside-modifying enzymes. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(5):499-503.
48. Nakamura A, Nakazawa K, Miyakozawa I, Mizukoshi S, Tsurubuchi K, Nakagawa M, O'Hara K, Sawai T. Macrolide esterase-producing *Escherichia coli* clinically isolated in Japan. *J Antibiot (Tokyo).* 2000;53(5):516-24.
49. Heritage J, M'Zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44(3):309-18.
50. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicilin. 1940. *Rev Infect Dis.* 1988;10(4):677-8.
51. Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8(4):557-84.
52. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev.* 2010;23(1):160-201.
53. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980;289(1036):321-31.
54. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3):969–976.
55. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(8):3203-6.
56. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2009;22(1):161-82.
57. Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined beta-lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 1983;12(5):507-10.
58. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):1-14.

59. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum beta-lactamases. *Can J Microbiol.* 2004;50(3):137-65.
60. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14 Suppl 1:42-52.
61. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant gram-negative infections. *Crit Care.* 2010; 14(3):224.
62. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1):15-22.
63. Carfi A, Pares S, Duee E, Galleni M, Duez C, Frere JM, Dideberg O. The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *EMBO J.* 1995;14(20):4914-21.
64. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(11):3028-3034.
65. Chen GX, Zhang R, Zhou HW. Heterogeneity of metallo-beta-lactamases in clinical isolates of *Chryseobacterium meningosepticum* from Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(4):750-2.
66. Yotsuji A, Minami S, Inoue M, Mitsuhashi S. Properties of novel beta-lactamase produced by *Bacteroides fragilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983;24(6):925-9.
67. Mercuri PS, Ishii Y, Ma L, Rossolini GM, Luzzaro F, Amicosante G, Franceschini N, Frere JM, Galleni M. Clonal diversity and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microb Drug Resist.* 2002;8(3):193-200.
68. Leclercq R, Courvalin P. Bacterial resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics by target modification. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35(7):1267-72.
69. Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. *Trends Microbiol.* 1996;4(10):401-7.

70. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. Başustaoğlu A (Çeviri editörü). Klinik mikrobiyoloji. Manual of clinical microbiology. İç: Rice LB, Bonomo RA, editors. Gür D. Antibakteriyel ilaçlara direnç mekanizmaları. 9. baskı. Washington DC: ASM Press. Ankara: Atlas Kitapçılık; 2009.s.1114-1145.
71. Hakenbeck R, Coyette J. Resistant penicillin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 1998;54(4):332-40.
72. Katayama Y, Robinson DA, Enright MC, Chambers HF. Genetic background affects stability of *mecA* in *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(5):2380-3.
73. Hackbarth CJ, Kocagoz T, Kocagoz S, Chambers HF. Point mutations in *Staphylococcus aureus* PBP 2 gene affect penicillin-binding kinetics and are associated with resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39(1):103-106.
74. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 1980;77(7):3974-3977.
75. Turng B, Sinha J, Deal M, Pollitt J, Callihan D, Brasso B, Wiles T, Reuben J. Detection and interpretation of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance among *Staphylococcus* with Phoenix automated microbiology system and BDXpert™ system. 15th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease (ECCMID), Copenhagen, 2005.
76. Munoz-Bellido JL, Alonzo Manzanares M, Martinez Andres JA, Gutteriez Zufiaurre MN, Ortiz G, Segovia Hernández M, Garcia-Rodriguez JA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(2):354-6.
77. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(2):255-64.
78. Giske CG, Martinez-Martinez L, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Simonsen GS, Zemlickova H,

- Cohen-Stuart J, Gniadkowski M. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST, Aralık, 2012.
79. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20(3):440-58.
 80. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci.* 1994;91(16):7693-7.
 81. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487-9.
 82. Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 2009;58:1303-8.
 83. Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25(4):682-707.
 84. Bebrone C. Metallo-beta-lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol.* 2007;74(12):1686-701.
 85. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):381-93.
 86. Poeylout-Palena AA, Tomatis PE, Karsisiotis AI, Damblon C, Mata EG, Vila AJ. A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007;17(18):5171-4.
 87. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):306-25.
 88. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):112-22.

89. Cagnacci S, Gualco L, Roveta S, Mannelli S, Borgianni L, Docquier JD, Dodi F, Centanaro M, Debbia E, Marchese A, Rossolini GM. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):296-300.
90. Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(3):669-72.
91. Psychogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouvelekis LS. Ongoing epidemic of blaVIM-1-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(1):59-63.
92. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2006;57(3):373-83.
93. Poirel L, Heritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22.
94. Docquier JD, Calderone V, De Luca F, Benvenuti M, Giuliani F, Bellucci L, Tafi A, Nordmann P, Botta M, Rossolini GM, Mangani S. Crystal structure of the OXA-48 beta-lactamase reveals mechanistic diversity among class D carbapenemases. *Chem Biol.* 2009;16(5):540-7.
95. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1597-1606
96. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(6):2546-51.
97. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Laurent Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4896–4899.

98. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan ÖA, Cilli F, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 1369–1373.
99. Aubert D, Naas T, Heritier C, Poirel L, Nordmann P. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *J Bacteriol.* 2006;188(18):6506-14.
100. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-61.
101. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9): 597-602.
102. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):355-62.
103. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011;11(3):164.
104. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob agents chemother.* 2008; 52(8):2950–2954.
105. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(1):91-3.

106. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. <http://www.eucast.org>
107. Lee K, Kim CK, Yong D, Jeong SH, Yum JH, Seo YH, Docquier JD, Chong Y. Improved performance of the modified Hodge test with MacConkey agar for screening carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. *J Microbiol Methods*. 2010;83(2):149-52.
108. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 1994;38(1):71-8.
109. Kim SY, Hong SG, Moland ES, Thomson KS. Convenient test using a combination of chelating agents for detection of metallo-beta-lactamases in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*. 2007;45(9):2798-801.
110. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008;14(7):1178-80.
111. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(7):1319-21.
112. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17(4):552-6.
113. Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(9):4048-50.

114. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, Orenge S, Wilkinson K, Woodford N, Zhang J, Livermore DM, Abbasi SA, Raza MW. Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(10):2288-94.
115. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari AC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol.* 2007;45(2):544-7.
116. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, Paniara O, Pantazatou A, Papagiannitsis CC, Platsouka E, Stefanou I, Tzelepi E, Vagiakou H, Miriagou V. Detection of metallo- β -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods.* 2010;83(2):185-7.
117. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol.* 2012;61:809-12.
118. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(8):1865-9.
119. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):88-90.
120. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3321-4.
121. Hrabak J, Walkova R, Studentova V, Chudackova E, Bergerova T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption

- ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3222-7.
122. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA; Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(3):205-10.
 123. Lepelletier D, Andremont A, Grandbastien B; National Working Group. Risk of highly resistant bacteria importation from repatriates and travelers hospitalized in foreign countries: about the French recommendations to limit their spread. *J Travel Med.* 2011;18(5):344-51.
 124. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2011;49(6):2239-42.
 125. Landman D, Salvani JK, Bratu S, Quale J. Evaluation of techniques for detection of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5639-41.
 126. Carrer A, Fortineau N, Nordmann P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(5):1913-4.
 127. Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):718-21.
 128. Reglier-Poupet H, Naas T, Carrer A, Cady A, Adam JM, Fortineau N, Poyart C, Nordmann P. Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Med Microbiol.* 2008;57:310-5.
 129. Moran Gilad J, Carmeli Y, Schwartz D, Navon-Venezia S. Laboratory evaluation of the CHROMagar KPC medium for identification of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70(4):565-7.
 130. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

- and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2010;48(3):836-41.
131. Ruppe E, Armand-Lefevre L, Lolom I, El Mniai A, Muller-Serieys C, Ruimy R, Woerther PL, Bilariki K, Marre M, Massin P, Andremont A, Lucet JC. Development of a phenotypic method for detection of fecal carriage of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* after incidental detection from clinical specimen. *J Clin Microbiol.* 2011;49(7):2761-2.
132. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol.* 2012;50(8):2761-6.
133. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, Pfeffer I, Tarabeia J, Moskovich R, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the *Enterobacteriaceae* family. *J Clin Microbiol.* 2009;47(10):3261-5.
134. Naas T, Ergani A, Carrer A, Nordmann P. Real-time PCR for detection of NDM-1 carbapenemase genes from spiked stool samples. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4038-43.
135. Tan TY, Ng LS, He J, Koh TH, Hsu LY. Evaluation of screening methods to detect plasmid-mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):146-9.
136. Bakthavatchalu S, Shakthivel U, Mishra T. Detection of ESBL among AmpC producing *Enterobacteriaceae* using inhibitor-based method. *Pan Afr Med J.* 2013;14:28.
137. Coudron PE. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4163-7.
138. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009;47(2):362-7.

139. Markelz AE, Mende K, Murray CK, Yu X, Zera WC, Hospenthal DR, Beckius ML, Calvano T, Akers KS. Carbapenem susceptibility testing errors using three automated systems, disk diffusion, Etest, and broth microdilution and carbapenem resistance genes in isolates of *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4707-11.
140. Girlich D, Halimi D, Zambardi G, Nordmann P. Evaluation of Etest® strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):200-1.
141. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE Jr, Hanna B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis.* 2006;12(8):1209-13.
142. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(8):2999-3002.
143. Pasteran F, Lucero C, Soloaga R, Rapoport M, Corso A. Can we use imipenem and meropenem Vitek 2 MICs for detection of suspected KPC and other-carbapenemase producers among species of *Enterobacteriaceae*? *J Clin Microbiol.* 2011;49(2):697-701.
144. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, Kuti JL. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol.* 2010;48(7):2402-6.
145. Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(2):141-60.

146. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decre D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012;50(4):1295-302.
147. Ambretti S, Gaibani P, Berlingeri A, Cordovana M, Tamburini MV, Bua G, Landini MP, Sambri V. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Microb Drug Resist. 2013;19(3):212-5.
148. Alışkan HE, olakođlu Ő, Bostanođlu E, Turun T, Gmen JS. İki yıllık srete yapılan modifiye Hodge testi sonuçlarının irdelenmesi. ANKEM Derg. 2011;25(3):169-172.
149. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2012;18(9):1503-7.
150. Perçin D, olakođlu S, Durmaz S, Ekinciođlu P. Rektal sürüntü örneklerinde karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* taranmasında klasik yöntemlerle ertapenemli EMB besiyerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2012;46(4): 546-552.
151. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. J Antimicrob Chemother. 2007;59(4):786-90.
152. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. Int J Antimicrob Agents. 2011;37(5):415-9.
153. Neonakis IK, Stylianou K, Daphnis E, Maraki S. First case of resistance to tigecycline by *Klebsiella pneumoniae* in a European University Hospital. Indian J Med Microbiol. 2011;29(1):78-9.
154. Berot B, Poirel L, Nordmann P. Updated multiplex polymerase chain reaction for detection of 16S rRNA methylases: high prevalence among NDM-1 producers. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;71(4):442-5.

155. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frere JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM; ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(4):380-8.
156. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):128-32.
157. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2732-4.
158. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A, Tsakris A. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* strains by time-kill assay. *Int J Antimicrob Agents*. 2011;37(3):244-7.
159. Souli M, Rekatsina PD, Chryssouli Z, Galani I, Giamarellou H, Kanellakopoulou K. Does the activity of the combination of imipenem and colistin in vitro exceed the problem of resistance in metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates? *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(5):2133-5.
160. Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2010;48(10):3558-62.

161. Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G, Andersson DI. Biological costs and mechanisms of fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(9):2850-8.
162. Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, Panagea T, Giamarellou H. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(5):2395-7.
163. FDA drug safety communication: increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. <http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm> [09/01/2010]
164. Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):1963-71.
165. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(6):1119-25.
166. Falagas ME, Rafailidis PI, Ioannidou E, Alexiou VG, Matthaiou DK, Karageorgopoulos DE, Kapaskelis A, Nikita D, Michalopoulos A. Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(2):194-9.
167. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, Papadomichelakis E, Antoniadou A, Tsangaris I, Karaiskos I, Poulakou G, Kontopidou F, Armaganidis A, Cars O, Giamarellou H. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3430-6.
168. Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honore PM. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):14.

169. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(1):526-9.
170. 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 fosfomicin. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;35(3):240-3.
171. Michalopoulos A, Vartzili S, Rafailidis P, Chalevelakis G, Damala M, Falagas ME. Intravenous fosfomicin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):184-6.
172. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B; Turkish MYSTIC Study Group. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2007;59(4):453-7.
173. Akın A, Çoruh AE, Alp E, Canpolat DG. Anestezi yoğun bakım ünitesinde beş yıl içerisinde gelişen nozokomiyal enfeksiyonlar ve antibiyotik direncinin değerlendirilmesi. *Erciyes Tıp Dergisi.* 2011;33(1):007-016.
174. Gur D, Hascelik G, Aydın N, Telli M, Gultekin M, Ogunc D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gulay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas 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.
175. Kuzucu Ç, Yetkin F, Görgeç S, Ersoy Y. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.* 2011;45(1):28-35.
176. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)

<http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Pages/index.aspx>

177. Duman Y, Kuzucu Ç, Çuğlan SS. Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları. *Erciyes Tıp Dergisi*. 2011;33(3):189-196.
178. Tekin A, Deveci Ö, Dal T, Tekin R, Bacalan F, Akpolat N. Klinik örneklerden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında ertapenemin *in vitro* etkinliği. *Anatol J Clin Investig*. 2013;7(1):10-13.
179. Çıkman A, Gündem NS, Karakeçili F, Korkmaz E, Çıkman Ö. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. *ANKEM Derg*. 2012;26(3):131-136.
180. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(3):1028-33.
181. Daikos GL, Vryonis E, Psychogiou M, Tzouveleki LS, Liatis S, Petrikos P, Kosmidis C, Tassios PT, Bamias G, Skoutelis A. Risk factors for bloodstream infection with *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):784-8.
182. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK; Centers for Disease Control and Prevention Epicenter Program. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*. 2011;53(6):532-40.
183. CDC. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR*. 2009; 58:256-260.
184. Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, Stemer A, Weinstein RA. Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31(4):341-7.
185. Calfee D, Jenkins SG. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

- in intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29(10):966-8.
186. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Website with MIC-distributions. <http://mic.eucast.org> [23/12/2012]
187. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, Rossolini GM, Souli M, Giamarellou H. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010;16(2):102-11.
188. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, Solter E, Smollan G, Rubinovitch B, Shalit I, Carmeli Y; Israel Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Working Group. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis.* 2011;52(7):848-55.
189. Endimiani A, Depasquale JM, Forero S, Perez F, Hujer AM, Roberts-Pollack D, Fiorella PD, Pickens N, Kitchel B, Casiano-Colon AE, Tenover FC, Bonomo RA. Emergence of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital: a new challenge to our healthcare system. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(5):1102-10.
190. Munoz-Price LS, De La Cuesta C, Adams S, Wyckoff M, Cleary T, McCurdy SP, Huband MD, Lemmon MM, Lescoe M, Dabhajj FB, Hayden MK, Lolans K, Quinn JP. Successful eradication of a monoclonal strain of *Klebsiella pneumoniae* during a *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* outbreak in a surgical intensive care unit in Miami, Florida. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2010 ;31(10):1074-7.
191. Lemmen SW, Häfner H, Zolldann D, Stanzel S, Lütticken R. Distribution of multi-resistant Gram-negative versus Gram-positive bacteria in the hospital inanimate environment. *J Hosp Infect.* 2004;56(3):191-7.
192. Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S, Fortineau N, Kassis-Chikhani N, Boytchev I, Aggoune M, Segulier JC, Senechal H, Tavolacci MP, Coignard B, Astagneau P, Jarlier V. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill.* 2010;15(48).

193. Munoz-Price LS, Hota B, Stemer A, Weinstein RA. Prevention of bloodstream infections by use of daily chlorhexidine baths for patients at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(11):1031-5.
194. Zuckerman T, Benyamini N, Sprecher H, Fineman R, Finkelstein R, Rowe JM, Oren I. SCT in patients with carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*: a single center experience with oral gentamicin for the eradication of carrier state. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(9):1226-30.
195. Bilavsky E, Schwaber MJ, Carmeli Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*?: proactive versus reactive strategies. *Curr Opin Infect Dis.* 2010;23(4):327-31.

