



T. C.

İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK
TANIMLANMASI**

Dr. AYŞE TEKİN

UZMANLIK TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

PROF. DR. EMİNE SÖNMEZ

İSTANBUL, 2014

T. C.
İSTANBUL BİLİM ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ENFEKSİYON HASTALIKLARI VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

ENTEROBACTERİACEAE SUŞLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK OLARAK
TANIMLANMASI

Dr. AYŞE TEKİN

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. EMİNE SÖNMEZ

UZMANLIK TEZİ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

TABLO LİSTESİ

ŞEKİL LİSTESİ

SİMGE VE KISALTMALAR

1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.ENTEROBACTERİACEAE.....	3
2.1.1. Mikrobiyoloji ve Patogenez.....	3
2.1.2. Antijen yapıları.....	5
2.1.3 Virülans Faktörleri.....	7
2.1.3.1.Endotoksin.....	7
2.1.3.2. Ekzotoksinler.....	7
2.1.3.3. Adhezinler ve Kapsül.....	7
2.1.4 <i>Enterobacteriaceae</i> Enfeksiyonları.....	8
2.2 BETA LAKTAM ANTİBİYOTİKLER.....	10
2.2.1. Karbapenemler.....	11
2.2.1.1. Karbapenemlerin Sınır Değerleri.....	12
2.2.1.2. İmipenem.....	13
2.2.1.3. Meropenem	14
2.2.1.4. Ertapenem.....	14
2.2.1.5. Doripenem.....	15
2.3.ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI	15
2.3.1.İntrinsik Direnç (Doğal Direnç).....	15
2.3.2.Kazanılmış Direnç.....	16
2.3.3.Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç.....	16
2.4. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARILARI.....	16
2.4.1.İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler.....	16
2.4.2.Dış membran geçirgenliğinin bozulması:.....	16

2.4.3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi.....	17
2.4.4. Efluks pompası.....	17
2.5. BETA-LAKTAMAZLAR.....	18
2.6. KARBAPENEMAZLAR.....	19
2.6.1. Sınıf A (Fonksiyonel 2f) Karbapenemazlar.....	21
2.6.1.1. Kromozomla kodlanan enzimler: SME, NMC ve IMI.....	22
2.6.1.2. Plazmidle kodlanan enzimler: KPC ve GES.....	23
2.6.2. Sınıf B (Fonksiyonel grup 3) Metallo-beta-laktamazlar.....	24
2.6.2.1. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-beta-laktamazlar.....	25
2.6.2.2. Aktarılabılır Metallo-beta-laktamazlar	26
2.6.3. Sınıf D Serin Karbapenemazlar; OXA beta-laktamazlar.....	27
2.6.3.1. OXA-48 beta-laktamazı.....	30
3. MATERYAL – METOD.....	31
3.1. FENOTİPİK TESTLER.....	31
3.1.1. Vitek-2 Sistemi ile Tür Tayini ve Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	32
3.1.2. E-test yöntemi.....	32
3.1.3. MBL E-test (IPM/IPM+EDTA E-test).....	32
3.1.4. Modifiye Hodge Testi.....	32
3.2. GENOTİPİK TESTLER.....	33
3.2.1. Multipleks PCR.....	33
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM.....	35
4. BULGULAR.....	36
5. TARTIŞMA.....	48
6. SONUÇ	61
7. ÖNERİLER.....	63
8. ÖZET.....	63
9. SUMMARY.....	64
10. KAYNAKLAR.....	66

TEŞEKKÜR

Tüm hayatım boyunca desteklerini hep yüreğimde hissettiğim aileme,

ŐiŐli Hamidiye Etfal Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğı'nde birlikte çalıŐtıđım asistan arkadaşlarıma ve uzmanlarıma,

Eğitim sürecimde bilgilerini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Zehra Çağla Karakoç, Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Demirel ve Yrd. Doç. Dr Nur Efe İris'e,

ŐiŐli Hamidiye Etfal Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Kliniğı Eğitim Sorumlusu Uz. Dr. Nuray Uzun Kes'e ve sevgili hocam Prof. Dr. Emine Sönmez'e teşekkür ederim.

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: <i>Enterobacteriaceae</i> türleri.....	6
Tablo 2: Karbapenemlerin sınıflandırılması	11
Tablo 3: 2013 CLSI <i>Enterobacteriaceae</i> için karbapenem sınır değerleri.....	13
Tablo 4: Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması.....	19
Tablo 5: Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri.....	21
Tablo 6: Materyal ve kliniklere göre dağılım.....	36
Tablo 7: Hastaların demografik özellikleri.....	37
Tablo 8: Etkenlerin dağılımı.....	37
Tablo 9: Karbapenemlere duyarlılık tablosu.....	39
Tablo10: Fenotipik testler.....	41
Tablo11: Multiplex PCR	41
Tablo 12: Karbapenemlerin OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ilişkisi.....	42
Tablo 13: MHT ile OXA 48 direnç geni pozitifliği ilişkisi.....	43
Tablo 14: MBL E test ile NDM 1 direnç geni ilişkisi.....	43
Tablo 15: Ertapenem Disk Difüzyon ile MIC değerleri uyumu.....	43
Tablo 16: Ertapenem E Test ile Vitek uyumu.....	44
Tablo 17: MEM disk difüzyonu ile MEM E test, Vitek MIC uyumu.....	44
Tablo 18: Meropenem E Test ile Vitek uyumu.....	44
Tablo 19: İMP disk difüzyonu ile İMP E test, Vitek MIC uyumu.....	45
Tablo 20: İmipenem E Test ile Vitek uyumu.....	45
Tablo 21: Diğer antibiyotiklere duyarlılık.....	47

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: Gram negatif basiller.....	3
Şekil 2: Antibiyotik hedef bölgeleri.....	11
Şekil 3: Karbapenem yapısı.....	12
Şekil4: Etken ve materyal dağılımı.....	38
Şekil 5: Mortalite ve servislere göre dağılım.....	38
Şekil 6: Karbapenemlerin Disk Difüzyon yöntemine göre sonuçları.....	39
Şekil 7: Karbapenem E Test yöntemine göre MIC sonuçları.....	40
Şekil 8: Karbapenem Vitek sistemine göre MIC sonuçları.....	40
Şekil 9: Fenotipik Testler.....	41
Şekil 10: Multiplex PCR	42
Şekil 11: Antibiyotik duyarlılıkları 1.....	46
Şekil 12: Antibiyotik duyarlılıkları 2.....	46

SİMGE VE KISALTMALAR

YBÜ	: Yoğun bakım ünitesi
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
GN	: Gram negatif
GP	: Gram pozitif
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PBP	: Penisilin bağlayan protein
MIC	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MHT	: Modifiye hodge testi
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
NDM	: New Delhi metallo-beta-laktamaz
VIM	: Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase
IMI	: Imipenem-hydrolyzing beta-lactamase
SME	: <i>Serratia marcescens</i> enzyme
GIM	: German imipenemase
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
CYB	: Cerrahi yoğun bakım
IMP	: İmipenem
MEM	: Meropenem
ERT	: Ertapenem
KCN	: Potasyum siyanitli
AMC	: Amoksisilin-Klavulanik Asit,
TZP	: Piperasilin-tazobaktam,
CAZ	: Seftazidim,
CRO	: Seftriakson
FEB	: Sefepim,
AN	: Amikasin,
GM	: Gentamisin,
CİP	: Siprofloksasin
COL	: Kolistin
SXT	: Trimetoprim-sulfamethoxazol

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bakterilerde giderek artan antibiyotik direnci, bu tür dirençli kökenlerle oluşan enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlara yol açmaktadır.

21. yüzyılın başında, tedavi için az sayıda antibiyotik seçeneği olan hayati tehdit oluşturan enfeksiyonlarla yeniden karşı karşıya kalınmıştır. Bununla birlikte, bir önceki yüzyıldan farklı olarak, bu enfeksiyonlara daha büyük sıklıkla gram negatif patojenler neden olmaktadır [1].

Enterobacteriaceae ailesi tıbbi önemi olan çok sayıda gram negatif (GN) bakterilerin bir araya geldiği ve gastrointestinal florayı oluşturan elemanlardır. İnsanlarda sistit, pyelonefrit, septisemi, pnömoni, cihaz ilişkili enfeksiyonlar, peritonit, menenjit gibi enfeksiyonlara en sık neden olan patojenler arasındadır. *Enterobacteriaceae* ailesi toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların kaynağıdır [2]. Bu bakterilerdeki antibiyotik direncindeki artış, toplum sağlığı için önemli bir tehdit unsuru haline gelmiştir. Özellikle son yıllarda başta yoğun bakım üniteleri (YBÜ) ve pediatri üniteleri olmak üzere dahiliye ve cerrahi ünitelerinde ağır morbidite ve mortaliteye yol açan önemli nozokomiyal patojenler olarak tespit edilmektedirler [3].

Karbapenemler, günümüzde kullanımda olan antibiyotikler arasında bilinen en geniş spektruma sahip antibiyotik sınıfıdır. *Enterobacteriaceae* ailesine bağlı enfeksiyonların tedavisinde daha önceleri ilk seçenek olarak beta-laktam grubu antibiyotikler seçilmekteydi. Ancak beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinden sorumlu beta-laktamaz enzimlerinin ortaya çıkışı tedavide yeni seçeneklerin aranması gerekliliğini ortaya çıkarmıştır [4, 5]. Sefotaksim, seftriakson ve seftazidim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlerin 1980'li yılların ilk yarısında klinik kullanıma girmesinden sonra, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* dünyada önemli bir problem olmaya başlamıştır [6, 7]. Yapılan çalışmalarda GSBL üreten *K. pneumoniae* prevalansının Kore 'de % 30, Amerika Birleşik Devletleri 'nde bazı bölgelerde % 50 ye kadar ulaştığı gösterilmiştir. . Bu durumda da *Enterobacteriaceae* ailesindeki hızla artan GSBL aktivitesi karbapenemlerin tedavideki önemini arttırmıştır [8, 9].

Karbapenemler geniş antibakteriyel spektrumlarıyla aerop ve anaerop birçok mikroorganizma tarafından oluşturulan enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [10, 11]. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde, özellikle karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşları son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde sıklıkla izole edilmektedir [12].

Karbapenemleri parçalayarak dirence yol açan karbapenemaz enzimlerden Ambler sınıf A da yer alan “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC) gen ailesinin ilk üyesi bir *K. pneumoniae* suşundan 1996 yılında izole edilmiştir. KPC beta-laktamazlar çoğunlukla *K. pneumoniae*'da bulunsa da *Escherichia coli*, *Enterobacter* ve *Salmonella* türlerinde de saptandığı bildirilmektedir. Ambler sınıf B de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimler ise sıklıkla nonfermantatiflerde bulunmakla birlikte, enterik bakterilerde de bildirilmektedir. En sık görülen MBL'lar Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase (VIM), IMP, SIM ve GIM enzim aileleridir.

Ülkemiz için ise enterik GN bakterilerde henüz KPC ve New Delhi metallo-beta-laktamaz (NDM) direnci olgu sunumları şeklinde bildirilmektedir. Ancak, özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olan enterik GN bakteriler arasında sınıf D OXA karbapenemaz aracılı karbapenem direnci nadir değildir. Çok merkezli karbapenem direncinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar olmakla beraber direnç mekanizmalarına yönelik moleküler çalışmalar sınırlıdır [13, 14].

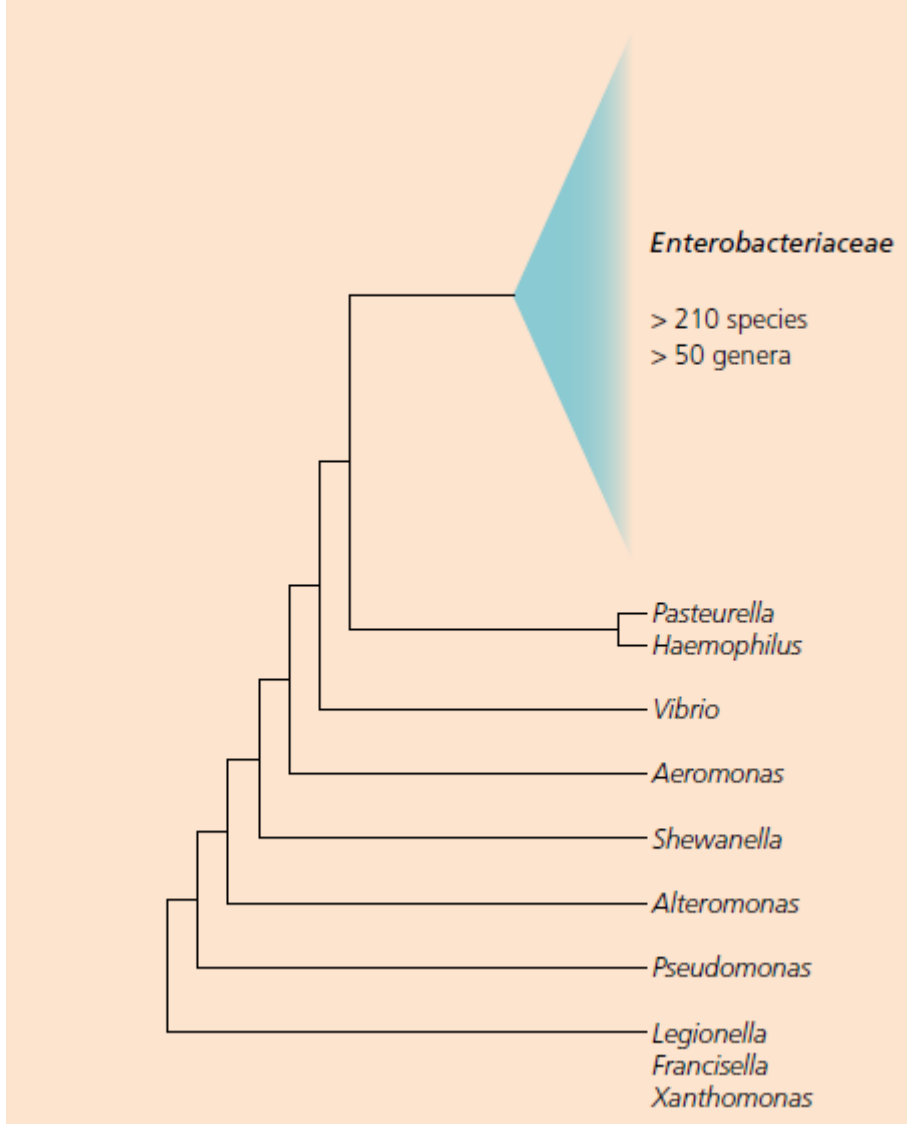
Bu çalışmada İstanbul Bilim Üniversitesi Avrupa Florence Nigthingale Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen karbapenem dirençli *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Fenotipik özellikleri ortaya koymak için Vitek-2 ve E-test ile antibiyogram testleri, imipenem/imipenem+EDTA testi, modifiye hodge testi kullanılmıştır. Genetik özelliklerini ortaya koymak için multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.ENTEROBACTERIACEAE

2.1.1. Mikrobiyoloji ve Patogenez

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerden *E.coli*, ilk kez 1884 yılında Teodor Esherich tarafından kolon florasının bir üyesi olarak tanımlanmıştır. *Klebsiella* cinsi adını, 19.yy'ın sonlarında yaşamış, Alman mikrobiyoloğu Edwin Klebs'den almıştır. Daha sonraları araştırmacı Carl Friedlander, *K. pneumoniae*'nin yaptığı ağır öldürücü pnömoni tablosunu ayrıntılı bir biçimde tanımlamıştır. Bundan dolayı *K. pneumoniae* yıllarca 'Friedlander basili' olarak adlandırılmıştır [15].



Şekil 1 Gram negatif basiller

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler gram negatif, genellikle homojen boyanan, 2-3 µm boyutlarında 0.3-1.0 µm eninde, uçları yuvarlak görünümlü bakterilerdir, spor oluşturmazlar. *E.coli* cinsinde bazı kökenler ve *Klebsiella* cinsinde çoğu köken belirgin kapsül oluşturur. *Klebsiella* cinsi hareketsiz iken *E. coli* hareketlidir. *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerin tümü fakültatif anaeroptur. Bu bakterilerin birçoğunun optimum üreme sıcaklığı 35-37 ° C olmasına karşın, özellikle bitkilerde ve doğada bulunan türler daha düşük sıcaklıklarda üremeyi tercih eder. Genel olarak üreme sıcaklık sınırları 15- 45 ° C olarak kabul edilir.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler zenginleştirici herhangi bir katkı içermeyen birçok besiyerinde rahatlıkla üreyebilir. Buyyon besiyerinde 8- 12 saatte bulanıklık oluşturur.

Eski kültürlerde dipte ve tüp kenarlarında çökelti ve yüzeyde bir zar oluşumu görülebilir. Jeloz besiyerinde 18- 24 saatte çoğu köken 2-3 mm çapında, ortası kabarık, düzgün kenarlı ‘S’ koloni oluşturur. Bazı türler birkaç pasajdan sonra kenarları ve yüzeyi düzensiz ‘R’ koloni formuna dönüşebilir. *Klebsiella* cinsi bakterilerin belirgin kapsül oluşturan kökenlerin kolonileri ‘M’ tipindedir.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler metabolik olarak çok aktiftir. Tümü glikozu fermente eder, bazıları gaz oluşturur. Glikoz dışındaki birçok karbonhidratı da asit veya gaz oluşturarak fermente ederler. Aminoasitleri dekarboksilasyon yoluyla parçalarlar. Katalaz reaksiyonları pozitifdir. Sitokrom oksidaz testi negatifdir. *Pantoea agglomerans* dışındaki kökenler nitratları nitritlere indirger [16].

Değişik karbonhidratları fermente etme, glikozdan gaz oluşturma, indol, metil kırmızısı, Voges-Proskauer, o-nitrophenyl-beta-D-galactosid (ONPG) deneyleri, lipaz, üreaz, fenil alanin deaminaz, arginin, lizin, ornitin dekarboksilaz, hareket, jelatini eritme, **Potasyum siyanitli** (KCN) ortamda üreme özellikleri bu aile içinde sınıflandırılan bakterilerin tanımlanmalarında sıklıkla kullanılan deneylerdir.

Biyokimyasal tanımlama testleri 36 ± 1 ° C ‘ de inkübe edilerek yapılır. Test sonuçları büyük çoğunluğunda 24 saatte pozitifleşir, bazı testler 48 saat sonunda tekrar değerlendirilir. *E. coli* suşlarının tamamı triptofandan indol yaparlar, metil kırmızısı deneyi pozitifdir. Voges-Proskauer testi olumsuzdur. Simons’un sitratlı besiyerinde üremezler. Bu testler, IMVIC testleri adını alır. *E. coli* için IMVIC testleri (++++)’dir. Fenilalanin deaminaz ve jelatin hidrolizi testlerinde negatif reaksiyon verirler. Üreaz negatiflerdir. Triptofandan indol yaparlar, H₂S oluşturmazlar. Potasyum siyanürlü besiyerinde üremezler. *Escherichia* cinsi

icinde *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii*, *E. vulneris* ve insanda enfeksiyona neden olmayan *E. blattae* türleri vardır.

Klebsiella cinsi bakterilerin tür düzeyinde tanımlamalarında kullanılan özellikler şunlardır; *Klebsiella*'lar fermentatif bakterilerdir. Birçok şekeri fermente etmelerine rağmen bu konuda kökenler arasında farklılık vardır. D-glukoz, laktoz ve sükrözü fermente etmelerinin yanında mannitol, adonitol, trehalozu da fermente ederler. Karbon kaynağı olarak malonat ve sitrati kullanırlar. *Klebsiella rhinoscleromatis* ise sitrati kullanamaz. Diğer tüm *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde olduğu gibi oksidaz etkinlikleri yoktur. *Klebsiella* cinsi bakteriler deoksiribonukleaz enzim aktivitesine sahip değildir. *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ornithinolytica* ve *Klebsiella planticola* bir aminoasit olan triptofanı indol, piruvik asit ve amonyak oluşturarak metabolize ederler. Karbonhidrat metabolizmalarının ara ürünü olarak asetil-metil-karbinol (asetoin) oluştururlar. *K. rhinoscleromatis* ve *Klebsiella terrigena* haric üreyi yavaş hidrolize eder ve Christensen'in üre agarında parlak pembe renk oluştururlar.

Klebsiella cinsi bakterilerden yalnızca *K. rhinoscleromatis*'de lizin dekarboksilaz enzimi yoktur ve bu nedenle lizini kadeverine dönüştüremez. Sadece *Klebsiella ozaenae* arjinin dihidrolaz enzimi ile ornitini putresine dönüştürebilme yeteneği vardır. *Klebsiella* cinsi bakteriler, H₂S üretmezler, fenilalanini deamine etmezler. *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis* laktozdan gaz oluştururlar. *Klebsiella* cinsi bakterilerin *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* cinsi bakterilerden ayırımında hareket yetenekleri ve DNAaz enzim aktiviteleri araştırılır.

Enterobacteriaceae türleri tablo 1 de gösterilmiştir.

2.1.2. Antijen yapıları

Pectobacterium chrysanthemi dışındaki tüm *Enterobacteriaceae* türlerinde 'ortak enterobakteria antijeni' (ECA=Enterobacterial common antigen) bulunur. Bu bakterilerin temel antijenik yapısı; hücre dış duvarında yer alan somatik antijen (O), kirpikli olan türlerde kirpik antijeni (H) ve bazı bakterilerde bakteri duvarını çevreleyen belirgin bir katman şeklinde, bazılarında ise bir yüzey maddesi şeklinde az miktarda bulunan kapsül antijeninden (K) oluşur.

TABLE 1 Biochemical reactions of the six species of *Escherichia* and selected members of the family *Enterobacteriaceae*^a

Species/biogroup	Indole production	Voges-Proskauer	Motility (35°C)	Yellow pigment	Lysine decarboxylase	Ornithine decarboxylase	Growth in KCN	Acetate utilization	Mucate utilization	D-Glucose, gas	Adonitol, acid	L-Arabinose, acid	D-Arabitol, acid	Cellobiose, acid	Dulcitol, acid	Lactose, acid	Sucrose, acid	D-Mannitol, acid	Raffinose, acid	L-Rhamnose, acid	D-Sorbitol, acid	D-Xylose
<i>Escherichia albertii</i> / biogroup 1 (n = 5) (e.g., Albert 19982)	0	0	0	0	100	100	0	20	20	100	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0
<i>Escherichia albertii</i> / biogroup 2 (n = 10) (e.g., former <i>S. boydii</i> 13)	100	0	0	0	0	100	0	0	0	40	0	100	0	0	0	0	0	100	0	0	100	0
<i>Escherichia blautae</i>	0	0	0	0	100	100	0	0	50	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100
<i>Escherichia coli</i>	98	0	95	0	90	65	0	90	95	95	5	99	5	2	60	95	50	98	50	80	94	95
<i>Escherichia coli</i> (inactive biotypes)	80	0	5	0	40	20	1	40	30	5	3	85	5	2	40	25	15	93	15	65	75	70
<i>Escherichia fergusonii</i>	98	0	93	0	95	100	0	96	0	95	98	98	100	96	60	0	0	98	0	92	0	96
<i>Escherichia hermannii</i>	99	0	99	98	6	100	94	78	97	97	0	100	8	97	19	45	45	100	40	97	0	100
<i>Escherichia vulneris</i>	0	0	100	50	85	0	15	30	78	97	0	100	0	100	0	15	8	100	99	93	1	100
<i>Shigella boydii</i> ^b	37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	94	0	0	12	1	0	99	0	1	59	27
<i>Shigella dysenteriae</i>	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	45	0	0	4	0	0	0	0	30	29	3
<i>Shigella flexneri</i>	42	0	0	0	0	0	0	8	0	3	0	60	1	0	2	0	1	91	33	5	30	3
<i>Shigella sonnei</i>	0	0	0	0	0	98	0	0	10	0	0	95	0	5	0	2	1	99	3	77	1	1
<i>Hafnia alvei</i>	0	85	85	0	100	98	95	15	0	98	0	95	0	15	0	5	10	99	2	97	0	98
<i>Hafnia alvei</i> /biogroup 1	0	70	0	0	100	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0	0
<i>Salmonella</i> serotype Paratyphi A	0	0	95	0	0	95	0	0	0	99	0	100	0	5	90	0	0	100	0	100	95	0
<i>Salmonella</i> serotype Choleraesuis	0	0	95	0	95	100	0	1	0	95	0	0	1	0	5	0	0	98	1	100	90	98
<i>Yersinia ruckeri</i>	0	10	0	0	50	100	15	0	0	5	0	5	0	5	0	0	0	100	5	0	50	0

^aValues are percentages of isolates tested with positive test results within 1 or 2 days of incubation at 35 to 37°C. Reactions for isolates that become positive after 2 days are not considered. Data were compiled from findings published by Ewing et al. (68), Wathen-Grady et al. (208, 209), Ansanuzaman et al. (8), Pryamukhina and Khomenko (163), and Farmer (71) and from unpublished findings from the reference laboratory at the CDC (1972 to 2005).

^bExcludes strains previously identified as *S. boydii* 13.

H antijeni kirpikleri (flagella) olan bakterilerde bu organelle bağlı olarak bulunur. H antijenleri birbirinden ayrı yapı ve özellikte değişik komponentlerden oluşmuştur. Bunların bir kısmı aynı türden bir grup bakteride ortak bulunan, bir kısmı ise daha özgül olup serovarları tanımlayan niteliktedir. H antijeni protein yapısındadır.

Fimbria antijeni *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerde hareketli ve hareketsiz şekillerde bulunan önemli bir yüzey antijenidir. Hemaglutinasyon oluşturma özelliğine, bu aglutinasyonun mannoz ile inhibe olup olmamasına, eritrosit dışındaki farklı hücelere yapışabilme özelliklerine göre beş ayrı tip fimbria tanımlanmıştır.

K antijeni bakteri duvarını çevreleyen kapsül katmanında, belirgin bir kapsül yapısı göstermeyen kökenlerde ise O antijeninin yüzeyini örten kapsül maddesinde bulunur. Polisakkarid yapısındadır. Yüzey antijenlerini içeren maddenin fagositozu, O anti serumunun etkisini ve komplemanın bakterisidal etkisini önleyici etkisi virülansta önemlidir [17-19].

2.1.3 Virülans Faktörleri

Virulans, mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneği olup, mikroorganizmanın patojenlik derecesini gösterir. Konağa giriş ve konağın primer savunma mekanizmalarından kaçış, konak hücrelerine tutunma (adezyon), mikroorganizmaların çoğalması ve yayılması, konak hücreye toksinlerle ya da inflamatuvar cevapla zarar verme, konağın sekonder savunma mekanizmalarından kaçış; bakteriyel patogenezin basamaklarını oluşturur. Mikroorganizmanın patojenliğinin başarısı bu basamakları kısmen ya da tamamen tamamlamasına dayanmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan bakteriler hastalandırıcı etkileri yönünden çok geniş bir spektrum oluştururlar.

2.1.3.1. Endotoksin

Gram negatif bakterilerin ortak özelliği, hücre duvarının temel yapı taşı olan lipopolisakkarid tabakanın endotoksin aktivitesi göstermesidir. *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerde de benzer şekilde O antijenini oluşturan lipopolisakkarid tabakanın lipid A fraksiyonu endotoksin özelliğindedir. Endotoksinler bakteri hücrelerinden dışarı salınmayan, bakterinin ölümü ve hücre duvarının yıkımı ile açığa çıkan ürünlerdir. Isıya, proteolitik enzimlere dayanıklı, asit hidrolizine duyarlı, pirojenik etkisi çok güçlüdür. Makrofajlar tarafından tümör nekrozis faktör (TNF) alfa yapımını ve çeşitli sitokinlerin salınımını artırır. Bütün bakterilerin endotoksinlerinin fizyolojik etkileri benzerdir [20-22].

2.1.3.2. Ekzotoksinler

Ekzotoksinler protein yapısında, sekresyon sistemi ile hücre dışına salınan ve özgül fizyolojik etkileri olan, dolayısıyla özgül semptomlar oluşturan, toksik etkileri oldukça güçlü moleküllerdir. Enterotoksijenik *Escherichia coli* 'nin (ETEC) ısıya duyarlı toksini, Enteroagregatif *Escherichia coli* 'nin (EAEC) ısıya dayanıklı toksini bunlara örnektir.

2.1.3.3. Adhezinler ve Kapsül

Enfeksiyöz süreçteki ilk kritik basamak mikroorganizmanın, konak mukozal yüzeyine mümkün olduğunca yaklaşmasını gerektirmektedir. Bu olay da en iyi adherans ile sağlanmaktadır [23].

Adhezinler bakterilerin yüzeyinde bulunan ve konak hücredeki özgü reseptörlere bağlanarak bakterilerin tutunmasını sağlayan ve fiziksel uzaklaştırmaya direnç göstermeye

yarayan proteinlerdir. Fimbrialar adezyondan sorumlu en önemli bakteri yüzey adhezinleri yada ligandları olarak bilinmektedir. Fimbrialar genellikle gram negatif bakterilerde bulunurlar, fakat bazı gram pozitif bakterilerde de bulunabilirler. Çevre şartları fimbriaların oluşumunu etkiler. Oksijen, sıcaklık, pH ve bakterinin içinde bulunduğu ortam bunlar arasındadır [24, 25]. Bakterinin sitoplazmik membranından kaynaklanıp dışa doğru uzanan fimbrialar protein yapısında olup ‘pilin’ adı verilen ve birbirleri ile sarmal şekilde birleşmiş alt ünitelerden meydana gelmektedir. Çok kırılğan olan fimbrialar sürekli olarak kaybedilir ve yerlerine yenileri yapılır [16, 24, 25]. *E. coli*’lerin bazı kökenlerinde kapsül veya mukoid madde sentezine rastlanmamasına karşın, kapsülle aynı özellikte ancak serolojik olarak ortaya konabilen, bakteri yüzeyine yakın yerleşmiş ve antijenik yeteneği olan yapılara rastlanılmaktadır ki bunlar da kapsül olarak adlandırılmaktadır. Uropatojen *E.coli* suşlarının bilinen virulans faktörleri arasında kapsül oluşturma, üroepitelyal hücrelere yapışma yeteneği (adezyon), idrarda üreme hızı, serum direnci, P fimbriya varlığı, siderofor üretimi, sitotoksik nekrotizan faktor-1 ve hemolizin varlığı, belirli O ve K serogrubuna ait olma, kolisin V üretimi, antimikrobiyallere direnç gibi biyolojik özellikler sayılabilir [15]. *Klebsiella* cinsi bakterilerin geniş polisakkarit kapsülü, bakteri hücrelerini fagositozdan koruyan önemli bir virulans faktörüdür. Ayrıca infekte bölgeye lökosit göçünü geciktirir. *Klebsiella*’larda kapsül ve lipopolisakkaritlerde bulunan endotoksin dışında moleküler düzeyde herhangi bir virulans faktörü tanımlanmamıştır. *Klebsiella*’larda konak organizmadan demir iyonu sağlayabilen sideroforların varlığı gösterilmiştir. Sideroforlar sistemik enfeksiyon oluşturmada esansiyel bir faktör olan demiri sağlayarak mikroorganizmaların yayılımını kolaylaştırmaktadır [24, 25].

2.1.4 *Enterobacteriaceae* Enfeksiyonları

Enterobacteriaceae kökenleri insan barsak florasının en önemli bölümünü oluşturur. Gastrointestinal sistem dışında florada yaygın olarak bulunmazlar. Bu ailede yer alan bakteriler; gastroenterit ve enterokolit, üriner sistem enfeksiyonu (ÜSE), pnömoni, menenjit, sepsisemi, yara enfeksiyonu ve abse gibi birçok organ ve sistemde yerleşen enfeksiyonlarda etken olabilir. Birçok *Enterobacteriaceae* türü önemli nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında yer alır.

E.coli’ler patofizyolojik aktiviteleri ve oluşturdukları klinik sendroma göre sınıflandırılarak incelenirler. Biyolojik önemi olan *E.coli* suşları başlıca üç grupta sınıflandırılabilir:

- 1) Kommensal suşlar
- 2) Bağırsak patojeni suşlar (enterik veya ishal etkeni suşlar)
- 3) Ekstraintestinal patojenik suşlar (bağırsak dışı enfeksiyon etkeni suşlar; ExEC)
 - a. Üriner sistemde enfeksiyon yapanlar (UPEC)
 - b. Neonatal menenjit ve diğer yaygın enfeksiyonlara neden olanlar (ExPEC)

Bağırsak patojeni suşlar nadiren normal florada bulunurlar. Oral yolla alındıklarında gastroenterite ve kolite neden olurlar. Enterik hastalık yapan bu suşlar genellikle intestinal sistem dışında hastalık oluşturmazlar.

Altı farklı patojenik gruba ayrılmışlardır;

- 1- ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*)
- 2- EPEC (Enteropatojenik *E. coli*)
- 3- EIEC (Enteroinvaziv *E. coli*)
- 4- EHEC (Enterohemorajik *E. coli*)
- 5- EAEC (Enteroagregativ *E. coli*)
- 6- DAEC (Diffuz olarak adhezyon gösteren *E. coli*)

Ekstraintestinal enfeksiyonlar, hemen her yaşta ve her organda sık görülürler. Oluşturdukları enfeksiyonlar sıklıkla üriner sistem, safra kesesi ve yolları, periton, akciğerler, kemikler, meninksler, prostat, yumuşak doku ve kan dolaşımı gibi başka doku ve organlarda ortaya çıkabilir.

Kommensal suşlar fakültatif anaerobik intestinal floranın çoğunluğunu oluşturur ve genellikle hastalığa neden olmazlar. Ancak yabancı cisim varlığında (üriner kateter), üriner veya safra yolu obstrüksiyonu gibi lokal anatomik veya fonksiyonel anormalliklerde konak savunmasının bozulması sonucu ya da normalde steril olan bölgelerin feçes veya yüksek konsantrasyonda mikst bakteri ile ihlali ile hastalığa yol açabilirler [26].

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda % 5-10 oranında *K. pneumoniae* bulunmaktadır. Nadir olarak normal kişilerin orofarinkslerinde bulunur (taşıyıcı oranı %1-6). Doğada da çok yaygın olarak bulunmaktadır. *K. pneumoniae* tipik lobar pnömoni oluşturur. Fırsatçı enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilebilir. Çünkü *K. pneumoniae* solunum yolları savunma sistemi bozuk olan alkolik, diabetes mellitus, kronik tıkalı akciğer hastalığı olan kişilerde görülür. Bazı olgularda bronkopnömoni veya bronşit şeklinde gelişir.

Abse oluşumu, ampiyem, plörezi oluşma ihtimali yüksektir. Bu hastalarda ölüm oranı da yüksektir. Pnömoni olgularında K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip K tipleri sıklıkla izole

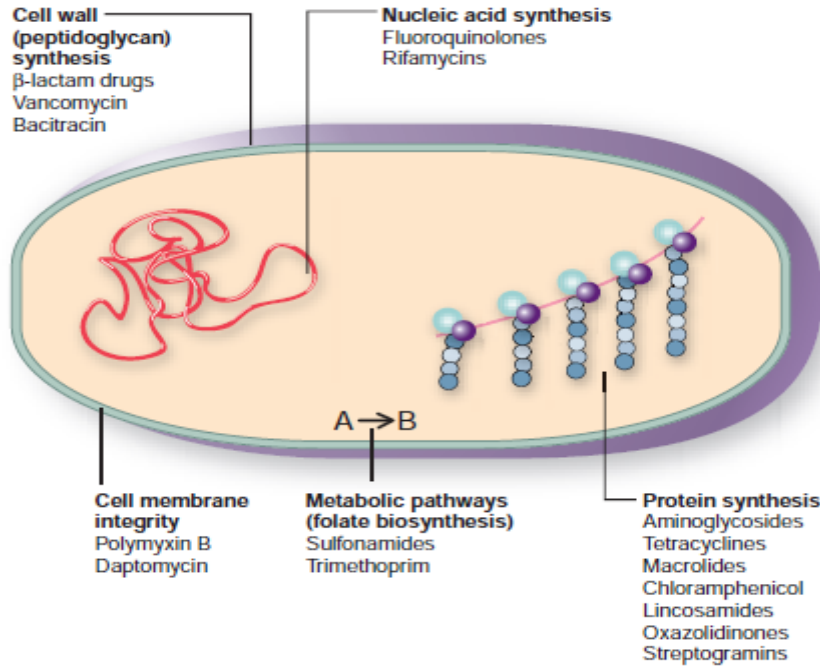
edilmektedir. *K. pneumoniae* USİ'larına, yara enfeksiyonlarına ve bakteriyemiye de yol açar [16, 27].

2.2.BETA LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

Beta-laktam antibiyotikler; antibakteriyel etki alanları, kimyasal yapıları ve farmakokinetik özellikleri farklı birçok antibiyotiğin bulunduğu geniş bir gruptur. Bu grubun üyelerinin ortak özellikleri; tümünün yapısında bir beta-laktam halkası bulunması, etki mekanizmaları ve kendilerine karşı gelişen direnç yollarıdır. Bu grup içinde yer alan antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

- 1-Penisilinler
- 2-Sefalosporinler
- 3-Monobaktamlar
- 4-Karbapenemler
- 5-Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam)

Tüm beta-laktam antibiyotikler bakterilerin sitoplazmik membranları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu olan Penislin Bağlayan Proteinler (PBP) adı verilen hedef proteinlere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Beta-laktam antibiyotikler tarafından PBP'leri inhibe edilen bakteride peptidoglikan sentezlenemeyeceğinden hücre duvar yapısı bozulmaktadır. Bu durum bakterinin ozmotik direnç kaybına ve ölümüne neden olmaktadır [28, 29].



Şekil 2: Antibiyotik hedef bölgeleri

2.2.1. Karbapenemler

Karbapenemler beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip, hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir. Bu grup antibiyotiklerin sınıflaması Tablo 2.1’ de verilmiştir. [30]. Birinci grup karbapenemler olan ertapenem ve panipenem özellikle toplumdan kazanılmış ciddi enfeksiyonların tedavisinde, ikinci grup karbapenemler ise güçlü nonfermantatif etkinlikleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Üçüncü grup karbapenem olan CS-023 ise ikinci grubun etkinliğine ek olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı da aktivite göstermektedir [31] .

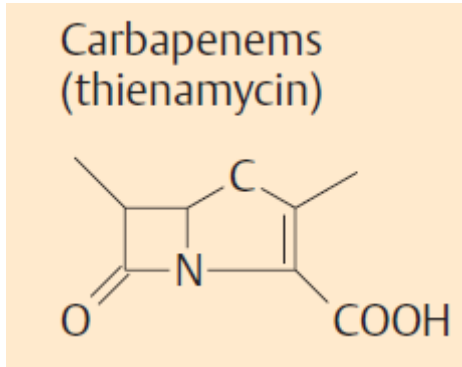
Tablo 2: Karbapenemlerin sınıflandırılması

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

Karbapenemler günümüzde kullanılmakta olan antibiyotiklerden antibakteriyel spektrumu en geniş olanlardır. Temel yapı, penisilinin beta laktam halkasına benzemektedir. Ancak bu

yapıda, 1. pozisyonadaki sülfür yerine karbon bulunmakta ve beş üyeli halkadaki 2. ve 3. karbon atomları arasında doymamış bağ yer almaktadır. Karbapenemlerin pek çok beta laktamaz enzimine dayanıklılığı, hidroksietil yan zincirdeki farklı trans konfigürasyondan kaynaklanmaktadır. Bu yapı tüm karbapenemlerde ortak olmakla birlikte, oral biyoyarlanımı olan faropenem, 1. pozisyonadaki sülfür nedeni ile diğer karbapenem sınıfındaki üyelerden farklılık gösterir.

Karbapenemler *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. GN ve GP bakterilerin hücre duvarı sentezi için gerekli olan PBP lere bağlanarak, bu enzimleri etkisiz hale getirmektedir. İmipenem, başlıca GN bakterilerdeki PBP 1 ve PBP 2'ye bağlanırken, meropenem bu mikroorganizmalardaki PBP 2 ve PBP 3'e seçici olarak bağlanmaktadır [32]. Meropenem, *E. coli*'nin önce PBP 2 sonra PBP 3 'üne bağlanır, aynı zamanda PBP 1a ve 1b'ye de iyi afinite göstermektedir. İmipenem esas olarak PBP 2, sonra 1a ve 1b 'ye bağlanırken PBP 3 'e afinitesi zayıftır [33]. Meropenem, *E.coli*'de ki primer PBP hedeflerini, imipenemden daha düşük konsantrasyonlarda doyumaktadır, bu da MİK değerlerinin daha düşük olmasını açıklamaktadır [34].



Şekil 3:Karbapenem yapısı

Karbapenemler; bazı *Bacteroides fragilis* suşları ve *Stenotrophomonas maltophilia* tarafından meydana getirilenler dışındaki plazmid ilişkili veya kromozomal olarak üretilen AmpC dahil olmak üzere birçok beta-laktamaza dayanıklıdır. Karbapenemazlar, karbapenem nükleusunun hidrolize olmasına, bakteri hücre duvarındaki porin kanallarının değişmesine ve ilacın permeabilitesinin azalmasına yol açar [10, 35].

2.2.1.1. Karbapenemlerin Sınır Değerleri

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2009'da karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'nin tespitini kolaylaştırmak için, karbapenemlere karşı minimum

inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değeri yükseltmiş veya disk difüzyon zonları küçültmüş ve *Enterobacteriaceae*'nin modifiye hodge testi (MHT) ile karbapenemaz üretimi açısından doğrulanmasını tavsiye etmiştir [36].

Enterobacteriaceae için CLSI karbapenem sınır değerlerini 2010'da tekrar değerlendirmiş; ertapenem, imipenem ve meropenem için karbapenem sınır değerlerini düşürmüştür ve doripenem için yeni sınır değerleri belirlemiştir (Tablo 2.3). Öte yandan yeni disk difüzyon çapları da eski rehberden daha geniş olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu yeni rehberde göre eskiden duyarlı olan pek çok suş orta düzey veya tam dirençli tanımlanmaktadır. Bu yeni sınır değerlerinin, karbapenemaz üretimini saptamak için ek bir teste gerek duymadan karbapenem tedavisi sonuçlarını daha doğru öngörebileceği bildirilmiştir.

Enterobacteriaceae için 2013 CLSI rehberi; laboratuvar güncel tanımlayıcı zon çaplarının uygulanmasına kadar Modifiye Hodge Testi (MHT) yapılmasını önermektedir. Güncel zon çapları uygulanması durumunda MHT'nin epidemiyolojik yada enfeksiyon kontrol prosedürleri dışında yapılması önerilmemektedir. Epidemiyolojik araştırmalar için MHT; karbapenemaz üreten izolatlar güncel zon çapları kullanıldığında bir ya da daha fazla karbapeneme intermediate yada dirençli olduğu durumlarda yapılması önerilmektedir.

Tablo 3: 2013 CLSI *Enterobacteriaceae* için karbapenem sınır değerleri [36]

Antibiyotik	Önceki sınır değerler (2009)		Yeni sınır değerler (2013)	
	MIC mg/L	Disk (mm)	MIC mg/L	Disk (mm)
Ertapenem	≤ 2 - ≥8	≥19 - ≤15	≤0.5 - ≥2	≥22 - ≤19
Imipenem	≤ 4 - ≥16	≥16 - ≤13	≤1 - ≥4	≥23 - ≤18
Meropenem	≤4 - ≥16	≥16 - ≤13	≤1 - ≥4	≥23 - ≤19
Doripenem	-	-	≤1 - ≥4	≥23 - ≤19

2.2.1.2. İmipenem

Bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olan imipenemin GP, GN, aerob ve anaerob mikroorganizmaları içine alan çok geniş bir etki spektrumu vardır. Farklı antibiyotik kombinasyonlarıyla kıyaslandığında, çeşitli ciddi enfeksiyonların tedavisinde son derece etkin bir monoterapötik ajandır ve in vitro olarak imipenem, klinik olarak önem taşıyan bakterilerin çoğuna etkilidir. Bu nedenle kritik hastalığı olan kişilerde özellikle dirençli GN etkenler veya polimikrobiyal enfeksiyon düşünüldüğünde, kültür ve antibiyogram sonuçlarını beklemeden ampirik olarak başlanabilir [37].

Bir beta-laktam halkası içermekle birlikte diğer beta-laktam antibiyotiklerden farklı olarak sis konfigürasyonundaki açıl amino yan zincirinin yerine trans konfigürasyonunda hidroksietil yan zinciri içerir. Trans konformasyonu imipenemin beta-laktamaz dayanıklılığını sağlar. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak 1. pozisyondaki karbon atomu sülfür ile değişmiştir. Bu yapı karbapenemlerin bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını artırır. Bu da antibiyotiğin etki spektrumunu genişletir ve antibakteriyel gücünü artırır. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre membranından girişini kolaylaştırır [38]. İmipenem bu geniş etki spektrumuna ve beta-laktamaz direncine karşın, böbrekte ileri derecede enzimatik yıkıma uğrar. Metaboliti nefrotoksik bir ajandır. Bu nedenle tek başına kullanılamaz. Bir dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1/1 oranında birleştirilerek kullanılmaktadır [39, 40].

2.2.1.3. Meropenem

Meropenem, imipenemin aksine insan böbrek dehidropeptidaz-I (DHP-1) enzimine karşı çok yüksek stabilite gösterir. Klinik olarak önemli olan hemen tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. İmipenem ve meropenemin başlıca hedefi PBP 2 dir. Ancak meropenem, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli*'nin PBP 2 ve PBP 3'üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve GN bakterilerdeki karbapenemazlar dışında diğer tüm beta-laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden imipenem GP organizmalara karşı daha etkili gözükürken, meropenem GN'lere özellikle de *P. aeruginosa*'ya daha etkilidir [41, 42].

Meropenem genel olarak 3.kuşak sefalosporinlerden daha güçlü bir indükleyici olmasına karşın, *Enterobacter* ve *P. aeruginosa* izolatlarındaki grup 1 beta-laktamazlar üzerindeki indükleyici etkisi imipeneme göre daha zayıftır [43, 44].

2.2.1.4. Ertapenem

Ertapenem'in birçok GP ve GN aerobik ve anerobik bakterilere karşı aktivitesi vardır ve genellikle toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılır [45, 46]. Diğer karbapenemlerin sahip olduğu birçok yararlı yapısal özelliklere sahiptir ancak dış membranında benzoik asid yerine meta grubunun yer alması onu diğer karbapenemlerden ayırır ve bunun sonucunda molekülün plazma proteinlerine bağlanma kapasitesi artar. Ertapenemin protein bağlanma kapasitesi % 95 iken bu oran imipenem için % 20'dir. Bu yüksek protein bağlanma kapasitesi sonucunda ertapenemin serbest kısmı azalır ve plazma yarılanma zamanı uzar. Esas olarak böbreklerden atılır ve eliminasyon yarılanma ömrü imipenem ve meropeneme göre belirgin derecede artar ve uzun etkili sefalosporinlerde olduğu gibi günde tek doz (1 gr/gün) tedavi rejimi uygulama imkanı verir [46, 47].

Ertapenem anyonik karakteri, lipofilik ve yüksek molekül ağırlığı özelliğinden dolayı bakterinin OprD porininden giremez. Bundan dolayı *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* gibi nonfermantatif bakterilere karşı diğer karbapenemlerden daha az etkilidir [48-51]. Ertapenemin metisiline dirençli stafilokok türlerine etkisiz olması PBP'lerdeki değişiklik sonucudur. Ertapenem MBL ve bazı diğer karbapenemazlar hariç GSBL ve ampC tipi beta-laktamaz üretenler de dahil olmak üzere beta-laktamaz üreten GN bakterilere oldukça etkili bulunmuştur [50-52].

2.2.1.5. Doripenem

Doripenem, birçok dirençli patojene karşı en etkin antibiyotik sınıfı olan karbapenemlerin en yeni üyesidir. Doripenemin etkinlik spektrumu meropenem ve imipeneminkine benzemektedir [53]. Bütün beta-laktam antibiyotikler gibi PBP'lere bağlanarak bakterinin hücre duvarı sentezini inhibe eder [54, 55].

Doripenem, duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike intraabdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonları, hastane kökenli pnömoni ve ventilatörle ilişkili pnömoni tedavisinde ruhsatlandırılmıştır [53].

2.3. ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Günümüzde antibiyotiklerin düzensiz kullanımının artması, yoğun bakım ünitelerinde yatan ve immun sistemi bozulmuş hasta sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi nedenlerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Direnç sorununun daha yoğun olarak yaşandığı yerler antibiyotik kullanımının daha yoğun olması nedeni ile hastanelerdir. Ülkemizde hastanelerde en sık direnç sorunu yaşanan mikroorganizmalar; *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* ve enterokoklardır [56, 57]. Bakterilerin antibiyotiklere direnci çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir.

2.3.1. İntrinsik Direnç (Doğal Direnç)

Bir bakterinin genetik özelliği nedeniyle bazı antibiyotiklere olan doğal direncini tanımlar. Antibiyotik kullanılması ile direnç gelişim hızı arasında ilişki yoktur. Örneğin vankomisin molekülü dış membran porlarından geçmek ve peptidoglikan tabakaya ulaşmak için fazla büyük olduğundan GN bakterilere etkisizdir [27].

2.3.2. Kazanılmış Direnç

Bakterinin genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı olarak; kromozom, transpozon veya plazmid DNA'sındaki mutasyonlarla ya da direnç geni taşıyan DNA dizilerinin başka bakterilerden tranformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon yoluyla alınması sonucu ortaya çıkan dirençtir [27].

2.3.3. Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç

Antibiyotiklerin in vitro ve in vivo etkinliklerinin farklılık göstermesine neden olan dirençtir. Dokudaki pH değişiklikleri, antibiyotiğin enfeksiyon bölgesine ulaşamaması ve oksijen basıncı değişiklikleri gibi nedenlerle in vitro testlerde etkili olarak değerlendirilen antibiyotik in vivo koşullarda etki göstermeyebilir [27, 58, 59].

2.4. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Beta-laktam antibiyotiklerin etki gösterebilmeleri için PBP'lere etkin konsantrasyonda bağlanması gereklidir. Bakteriler, bu basamakların her birinde bir engel oluşturarak direnç geliştirebilirler. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 4 yolla gelişebilmektedir.

2.4.1. İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler:

Beta-laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi olan PBP'lerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin beta-laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir [60-62]. *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae*'da gözlenen penisilin direnci ve metisiline dirençli *S.aureus*'da gözlenen direnç PBP'lerdeki değişiklikler ile oluşmaktadır [62].

2.4.2. Dış membran geçirgenliğinin bozulması:

Hücre zarının geçirgenliğinin azalması GN bakteriler için özellikle önem taşır. Beta-laktam antibiyotikler, GN bakterilerde dış membrandaki 'outer membrane protein' (OMP) adı verilen porlar yolu ile hücre içine girmektedir. Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca 2 kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir GN bakterisi porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç

geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalabilir. Öte yandan, özellikle *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir [62, 63]. Ancak bu tipte direnç geliştiren bakteri, diğer beta-laktam antibiyotiklere karşı çapraz direnç geliştiremez [64]. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir [62]. Geçirgenliğin azalmasına bağlı olan direnç özellikle enzimatik direnç ile birlikte ise yüksek düzeyde dirence yol açmaktadır. Bu direnç *P.aeruginosa* ve zor üreyen GN basillerde daha fazla klinik probleme yol açar.

2.4.3. Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi:

Beta-laktam antibiyotiklere karşı en çok gözlenen direnç, bakterilerin bu antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerini sentezlemesi ile oluşmaktadır. Beta-laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve benzeri beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek bu antibiyotikleri etkisiz hale getirip direnç gelişimine neden olurlar. Bu enzimler beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağı parçalayarak bir açıl-enzim türevi oluştururlar. Daha sonra enzim açıl molekülünden ayrılarak rejenere olur. Bakteride beta-laktamaz enzimi indüklenebilir veya yapısal olabilir. Gram Pozitif bakterilerde enzim genellikle indüklenebilir iken, GN bakterilerde beta-laktamazların bir kısmı indüklenebilir, bir kısmı da yapısal özelliكتedir. Beta-laktamaz genleri bakteri plazmid, kromozomu, transpozon veya integron gibi taşınabilir genetik elemanlar üzerinde bulunabilir [63]. Yapısal olarak PBP'lere benzerler. Beta-laktamazlar, hem GP hem de GN aerop ve anaerop bakteriler tarafından sentezlenir. Stafilokoklar; gram pozitif bakteriler arasında beta-laktamaz üreten en önemli patojenlerdir. Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta-laktamazları esas olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes*'ler tarafından üretilen beta-laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinlere etki eder. Beta-laktamaz üretimi; gram negatif bakterilerde beta-laktam direncindeki en önemli mekanizmadır. Gram Negatif bakterilerdeki bu beta-laktamazlar, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik aralıkta bulunurken, GP bakterilerde doğrudan hücre dışına salınmaktadır. Bu nedenle GN bakteri türlerinde beta-laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla antibiyotik geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır [65].

2.4.4. Efluks pompası:

Transport proteinlerinden oluşan efluks pompası da diğer bir direnç mekanizmasıdır. Antimikrobiklere dirençte en aktif araştırma alanlarından biri, bakteri hücresinden bir veya birden çok antibiyotik grubunu atan pompaların saptanması ve tanımlanmasıdır. Pompalar oldukça seçici olabilir veya geniş bir substrat özgüllüğü gösterebilir. Bu pompaların

çoğunluğu sitoplazmik zarda bulunmaktadır [66, 67]. Bazı durumlarda değişik tipteki pompaların bir araya gelmesi, tek bir pompa ile oluşandan daha yüksek düzeyde bir dirence yol açabilmektedir [66, 68].

2.5. BETA-LAKTAMAZLAR

Penisilinazın 1940'lı yıllarda Abraham ve Chain tarafından bulunmasından sonra günümüze kadar yaklaşık 400 civarında beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. Richmand ve Sykes tarafından 1973 yılında beta-laktamazlar sınıflandırılmış, bu sınıflandırma 1976 yılında Sykes ve Matthew tarafından genişletilmiştir [69-71].

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmaları kullanılmaktadır. Beta-laktamazlar 1980 yılında Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır [72, 73].

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin amino asiti taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.

Sınıf B: Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo-beta-laktamazlardır.

Sınıf C: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Bush ve arkadaşları 1989 yılında beta-laktamazları fonksiyonel benzerliklerine göre sınıflandırmışlardır. Fonksiyonel sınıflandırmada kullanılan bazı kriterler, antimikrobiyal substrat profil spektrumu, enzim inhibisyon profili, enzimin net yükü, hidroliz oranı (V_{max}), bağlanma afinitesi (K_m), izoelektrik noktası, protein moleküler ağırlığı ve amino asit kompozisyonudur. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasında 4 büyük grup ve çok sayıda alt grup bulunmaktadır. Bush ve arkadaşları 1995 yılında bu sınıflama üzerinde yapmış oldukları uyarlamalar ile tabloya son halini vermişlerdir. Beta-laktamazların özellikleri, amino asit değişiklikleri ve yeni katılan enzimlerin tanıtılması www.lahey.org/studies web adresinden duyurulmaktadır [5, 63].

Bu en yeni sınıflandırma şeması Tablo 4'te genel hatları ile görülmektedir [31]. Bu sınıflandırma klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram değerlendirmede üstünlük

sağlarken, tek bir nokta mutasyonu ile substrat özgülüğünün değişebilmesi ise dezavantajdır. Beta-laktamazların nükleotid dizilenmesini esas alan Ambler sınıflaması ise mutasyonlardan etkilenmemektedir [70, 71, 74].

Tablo 4. Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması [31]

Grup	Moleküler sınıf	Tercih ettiği substrat	Klavulanat ile inhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	CMY-2-13, LAT-1, MOX-1-2, ACC-1 FOX-1-6, MIR-1, CFE-1, BIL-1
2a	A	Penisilinler	+	Stafilokok penisilinazı
2b	A	Penisilin, sefalosporin	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, geniş Spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	+	TEM-3- TEM-26, SHV-2-6, PER, CTX-M, VEB, GES, IBC-1e (GSBL)
2br	A	Penisilinler	+/-	İnhibitor dirençli TEM enzimleri TEM-30-TEM-36, TRC-1
2c	A	Penisilinler, karbenisilin	+	Karbenisilini hidrolize eden enzimler, PSE-1-3-4, BRO-1, AER-1, SAR-1
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	+/-	Oksasilin ve karbapenem hidrolize eden enzimler OXA-48, OXA-51
2e	A	Sefalosporinler	+	<i>P. vulgaris</i> 'in indüklenebilir, sefalosporinazları. CepA, FEC-1, L2
2f	A	Penisilinler sefalosporinler, Karbapenemler	+	NMC, SME, IMI, KPC, GES
3	B	Karbapenemler, birçok beta-laktam	-	Çinko bağımlı karbapenemazlar; IMP, VIM, GIM. 3a, 3b, 3c alt gruplarına ayrılırlar
4	-	Penisilinler	-	Dizileri bilinmeyen çeşitli enzimler

2.6. KARBAPENEMAZLAR

Karbapenemazlar, en geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta-laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından imipenem veya meropenemden birini, belirgin şekilde hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil, diğer beta-laktam ajanlara da etkilidirler. Bu nedenle sadece karbapenem grubu beta-laktam ajanlara afinitesi diğer beta-laktamlara kıyasla daha fazla olan metallo-enzimler “karbapenemaz” olarak adlandırılmaktadır [75].

Karbapenemleri hidrolize eden karbapenemazlar, karbapenem kullanımına paralel olarak son yıllarda artan oranlarda bildirilmektedir. Karbapenemazlar doğal olarak bulunan kromozomal kaynaklı (intrinsik) ya da kazanılmış (ekstrinsik) olabilirler [76].

Kromozomal karbapenemazlar; *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, *Bacteroides fragilis* gibi bazı bakterilerde saptanmış olup kromozom kontrolünde olmaları nedeni ile oluşturdukları direnç sınırlı kalmıştır. Ancak son yıllarda plazmid kontrolünde olan karbapenemazların ortaya çıkması artık bu durumu değiştirmeye başlamıştır. Özellikle *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*'de ve daha nadir olmak üzere *Klebsiella spp.* ve *Serratia marcescens*'de bildirilmiş olan bu enzimler son yıllarda çeşitli ülkelerden artan sıklıkta bildirilmektedir [77, 78].

Kazanılmış karbapenemazlar karbapenemlerin yanında diğer beta-laktam grubu antibiyotikleri de hidroliz edebilme özelliklerine sahiptirler. Ambler sınıf A, B ve D beta-laktamaz üyesidirler [75]. Sınıf A karbapenemazları “*Serratia marcescens* enzyme” (SME), “not metalloenzyme carbapenemase” (NMC), “imipenem-hydrolyzing beta-lactamase” (IMI), “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC) ve GES enzimleri oluştururlar. Sınıf B karbapenemazları IPM, “Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase” (VIM), “German imipenemase” (GIM), “Sao Paulo MBL” (SPM), SIM ve “New Delhi metallo-beta-laktamaz” (NDM 1) enzimleri, sınıf D karbapenemazları ise oksasiline hidroliz eden “Oxacillin-hydrolyzing”(OXA) enzimleri oluştururlar [79].

Karbapenemaz enzimlerinden bazılarının moleküler sınıf ve fonksiyonel gruplarına göre substrat, hidroliz ve inhibisyon profilleri Tablo 5 'te görülmektedir [79-83].

Tablo 5: Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri [79]

		Hidroliz profilleri ^a					Inhibisyon profilleri ^b			
Moleküller sınıf	Fonksiyonel grup	Enzim	Penisilinler	Darspek. SS	Geniş Spek. SS	Aztreonam	Karbapenemler	EDTA	Klavulanik asit	
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+	
		IMI	+	+	+	+	+	-	+	
		SME	+	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IPM	+	+	+	-	+	+	-	
		VIM	+	+	+	-	+	+	-	
		GIM	+	+	+	-	+	+	-	
		SPM	+	+	+	-	+	+	-	
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±	

^asembolleri: +;kuvvetli hidroliz, ±;zayıf hidroliz, -;hidroliz yok

^bsembolleri: +;inhibisyon mevcut, ±;değişken inhibisyon, -;inhibisyon yok

2.6.1. Sınıf A (Fonksiyonel 2f) Karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemazların 3 büyük ailesini NMC/IMI, SME ve KPC enzimleri oluşturur. Bunların hidrolitik mekanizmaları, sınıf A beta-laktamazların Ambler numaralandırma sistemine göre aktif bölgesinde pozisyon 70'de bir serine gereksinim gösterir [84]. Fonksiyonel 2f sub grubunda yer alan beta-laktamazlar, karbapenem, sefalosporinler, penisilin ve aztreonam olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz ederler. Tazobaktam ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. Bu sınıfın 4. üyesi olan GES; beta laktamazları; başlangıçta bir GSBL ailesi olarak tanımlanırken, zamanla varyantların imipenem hidrolizinin zayıf olduğu anlaşılmış ve GES enziminin bu sub grubu fonksiyonel grup 2f karbapenemaz olarak sınıflandırılmıştır [79].

2.6.1.1. Kromozomla kodlanan enzimler: SME, NMC ve IMI

“*Serratia marcescens* enzyme” SME; kromozomal grup 2f beta laktamazları ekspres eden suşlar, karbapenem direnci ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin duyarlılıklarına göre ayrımları yapılabilir. İlk olarak SME-1 1982’de İngiltere’de iki *Serratia marcescens*’te tespit edilmiştir. SME-1 beta-laktamazi ile, bununla hemen hemen özdeş SME-2 ve SME-3 ABD’nin pek çok yerinden sporadik olarak bildirilmiştir [75, 77]. SME üreten *S. marcescens* ile oluşan enfeksiyonlar tek ya da en fazla 19 izolatlık küçük kümeler olarak saptanmıştır [78, 80]. Farklı coğrafik bölgelerden izole edilen SME üreten *S.marcescens*’ler pulsed-field jel elektroforez (PFGE) ile tanımlanmalarına göre özdeş bulunmamışlardır[80].

NMC “not metalloenzyme carbapenemase” ve **IMI** “imipenem-hydrolyzing beta-lactamase” enzimleri ABD, Fransa ve Arjantin’de *E. cloaca* izolatlarında nadir olarak tespit edilmişlerdir [81, 82]. NMC-A ve IMI 1’in amino asit benzerliği % 97 iken, SME 1 ile benzerlikleri yaklaşık %70 bulunmuştur [83]. Hepsinin korunmuş aktif bölgeleri A sınıfı beta-laktamazların S-X-X-K, S-D-N ve K-T-G motiflerini içermektedir. Ayrıca bu karbapenemazlar bir disülfid bağı olan pozisyon 69 ve 238’de korunmuş sistein rezidülerine sahiptirler. Bu 3 beta-laktamaz genleri kromozomal olarak kodlanırlar ve hareketli elemanlar ile kodlandığına dair kanıt olmadığından nadiren görülürler. Oysa, yakın zamanlarda ABD nehirlerinden izole edilen *Enterobacter absuriae* ve Çin’den izole edilen bir *E. cloaca*’da IMI-2 beta-laktamazının plazmidler ile kodlandığı bulunmuştur [84, 85].

Saflaştırılmış SME, NMC ve IMI enzimlerinin biyokimyasal özellikleri, bunların karbapenem, aztreonam, dar spektrumlu sefalosporin ve penisilinleri içeren geniş hidroliz spektrumlarını ortaya çıkarmıştır. İmipenem hidrolizi kolayca ölçülebilmştir. Meropenemin Kcat ve Km değerleri imipenemden daha düşük olarak belirlenmiştir. Beta-laktam antibiyotiklerin tümünde hidroliz tespit edilirken, sefoksitin ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin hidrolizinin zayıf olduğu, sefotaksim seftazidimden daha hızlı hidroliz olduğu tespit edilmiştir. Bu kromozomal beta-laktamazlar imipenem ve sefoksitin ile indüklenebilirler [71, 83, 86].

NMC-A’nın biri doğal, diğeri penisilanik asit inhibitörü ile kompleks olan iki kristal yapıları ile SME 1’in yapı ve katalitik rezidüleri, bunların diğer sınıf A betalaktamazlar ile benzer olduğunu göstermiştir [87, 88]. Aktif bölgenin yakınında pozisyon 69 ve 238 arasındaki disülfid bağlar Sınıf A karbapenemazların ortak özelliğidir. Disülfid bağları sadece imipenem hidrolizi için değil, enzimin yapısal olarak stabilizasyonu için gerekli olduğunu düşündüren hidrolitik aktivite için de gereklidir [87, 89].

2.6.1.2. Plazmidle kodlanan enzimler: KPC ve GES

“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” KPC 'yi diğer alt grup 2f enzimlerinden ayıran iki özellik vardır. Bunlar KPC enzimlerinin plazmidlerle taşınmaları ve substrat hidroliz spektrumlarının sefotaksim gibi aminothiazoloksim sefalosporinleri içermeleridir. KPC beta-laktamazlar özellikle *K. pneumoniae*'da sık olmakla birlikte *Enterobacter cloaca*, *Citrobacter freundii*, *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de bildirilmiştir [90, 91].

KPC ailesinin ilk üyesi KPC 1, 1996 yılında Kuzey Carolina'da (A.B.D.) Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (ICARE) surveyans projesi içinde *K. pneumoniae*'dan izole edilmiştir [92]. KPC 1'in keşfinden sonra KPC 2, KPC 3 enzimleri sırası ile A.B.D.'nin Maryland ve New York şehirlerinden bildirildikten sonra KPC tipi enzimler hızla dünya genelinde görülmeye başlamıştır [91]. KPC 2 enzimi Çin, Fransa, Kolombiya, İsrail, Yunanistan gibi ülkelerden bildirilmiştir [77, 93-96].

KPC karbapenemazlar plazmidlerde olduğundan, yayılması için büyük bir potansiyele sahiptir. Özellikle direnç determinantlarını toplama ve transfer etme kabiliyeti ile ünlü olan *K.pneumoniae*'da daha sıklıkla bulunmaktadır. Buna ek olarak klonal yayılımda çeşitli salgın hastalıkların, epidemik noktalarda bu organizmanın enfeksiyon kontrolünün zor olduğu görülmüştür [9, 90, 97-99]. Penisilin, sefalosporin, monobaktam, karbapenem olmak üzere tüm beta-laktamlara dirence yol açabilirler. Sınıf A olmasına rağmen klavulanik asit ile inhibe olmazlar, boronik asit ile inhibe olurlar [78, 100].

KPC tip karbapenemazların birkaç nedenden dolayı tespit edilmeleri zordur. Birincisi, GSBL ve AmpC beta-laktamazlar ile birlikte porin değişiklikleri veya kaybından dolayı membran geçirgenliğinin azalması, ikincisi imipenemin minimum inhibitör konsantrasyonunun (MIC) inokulum yoğunluğundan önemli derecede etkilenmesi, düşük inokulumun KPC üreten organizmalarda imipenem için duyarlı MIC değerlerine neden olurken, yüksek inokulumun imipenem ve meropenemin MIC düzeylerinde yükselmeye neden olması, üçüncüsü ise KPC sonuçlarının otomatize sistemler, mikrobroth dilüsyon ve E-test metodları arasında tutarsız sonuçlar vermesidir. Bu nedenlerden dolayı rutin laboratuvar testlerinde KPC taşıyan suşlar her zaman dirençli olarak saptanmayabilir [79].

GES/IBC ailesi, ilk olarak Fransız Guyanası'nda *K. pneumoniae*'dan, Yunanistan'da *E.cloaca*'dan IBC-1 (integron kaynaklı sefalosporin) olarak 2000 yılında tanımlanmış ve rapor edilmiştir ve en nadir karşılaşılan ailedir [101]. Enzimlerin GES ailesini kodlayan genler plazmidler üzerindeki integronlarda lokalizedir. Penisilin ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinler dahil geniş hidroliz spektrumuna sahiptirler [102]. GES/IBC ailesinin adlandırılması birkaç kez revizyona uğramıştır [103]. IBC isimlerinin GES'e dönüştürülmesi

sayesinde isimlendirmede fikir birliğine varılmıştır [103, 104]. En son Fransa'dan izole edilen *P. aeruginosa*' dan identifiye edilen GES-9 ile en az 9 GES varyantı tanımlanmıştır [105]. Nadiren de olsa GES enzimleri Brezilya, Portekiz, Kore, Yunanistan, Arjantin ve Güney Afrika'dan olmak üzere dünya çapında tespit edilmiştir. Bu enzimler en sık tek vakalar ile ilişkili olmuştur. Ancak GES-2 üreten *P. aeruginosa* suşlarının 8 hastada küçük bir nozokomiyal salgına ve Kore'de GES 5 üreten *K. pneumonia*'nın 6 hastada enfeksiyonlara sebep olduğu görülmüştür [106-111].

2.6.2. Sınıf B (Fonksiyonel grup 3) Metallo-beta-laktamazlar

Ambler tarafından MBL'lar, 1980 yılında sınıf B serin beta-laktamazlar içinde sınıflandırılmış, daha sonra 1989 yılında Bush, fonksiyonel özelliklerine göre bu enzimleri ayrı bir grup olan fonksiyonel grup 3 içerisinde sınıflandırmıştır. Bu sınıflama 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir [31, 75].

Diğer beta-laktamazlardan farklı olarak MBL'lar aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan enzimlerdir. Serin beta-laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi) etkilenmezler ama etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleridir. MBL enzimi ilk olarak 1960 yılında *Bacillus cereus*'ta, 1980'li yılların başında *Stenotrophomonas maltophilia*'da gösterilmiştir. Daha sonra imipenemi hidrolize eden MBL enzimi *Bacillus fragilis* ve *Aeromonas hydrophilia*' da da tanımlanmıştır [75, 79].

Japonya'da 1991 yılında *S.marcescens* ve *P. aeruginosa* suşlarında plazmid kökenli bir MBL enzimi (IMP-1) bulununcaya kadar sadece bu grupta kromozomal enzimlerin varlığı biliniyordu. Aktarılabılır MBL enziminin bulunmasıyla diğer mikroorganizmalarda karbapenemlere direnç gelişimi ile ilgili endişeler artmıştır. MBL'ları kodlayan genler genelde klas 1 (bazen klas 3) integronlarca taşınıp, sonra transpozonların içine yerleştirilip yüksek derecede aktarılabılır bir genetik araç elde edilir. Ayrıca integron içindeki başka gen kasetleri, aminoglikozid direncine neden olarak bu antibiyotiklerin alternatif tedavide kullanımını engeller. Bütün MBL'lar imipenemi hidrolize ederler, ancak bu özellikleri oldukça değişkendir ve hidroliz etme hızı bakterinin karbapenemlere direncinin seviyesi ile uyumlu olmayabilir. Buna göre bu enzimler imipenem ve diğer beta-laktamları hidrolize etme temeline göre alt gruplara (alt grup 3a, 3b, 3c) ayrılmıştır [75, 112].

2.6.2.1. Kromozomal Olarak Kodlanmış Metallo-beta-laktamazlar

Kromozomal olarak kodlanmış MBL enzimlerinin önemli özellikleri indüklenebilir özellikte olmalarıdır. Genelde doğada bulunan bazı bakteriler, aynı zamanda MBL enzimi de taşımaktadırlar. Bu enzimleri taşıyan çoğu bakteriler genellikle beta-laktam antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Bu bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler olup *S. maltophilia* ve *B. anthracis* dışında nadiren ciddi enfeksiyonlara neden olurlar. Kromozomal olarak MBL kodlayan bakteriler arasında; *Bacillus cereus* (BC2), *Bacillus anthracis*, *S. maltophilia* (L1), *A. hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB yada GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1) ve *Serratia fonticola* (SFH-1) sayılabilir [112-118]. Kromozomal kökenli bu enzimler genellikle serin beta-laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar. Örneğin; *A. hydrophilia* ve *Aeromonas veronii biovar sobia* üç beta-laktamaz enzimi üretirler. Bunlar penisilinaz, sefalosporinaz ve bir MBL enzimidir. Ya da beta-laktam antibiyotik tedavisi sırasında *S. maltophilia*'daki indüklenebilir L1 MBL enzimi ile birlikte, klas A kromozomal enzim L2'de sentezlenebilmektedir. Bu derepresyon olayı genellikle in vivo beta-laktam tedavisi altında iken $1/10^5$ - 10^7 sıklıkta oluşabilir [119].

2.6.2.2. Aktarılabılır Metallo-beta-laktamazlar

IMP ilk olarak Japonya'da 1988 yılında *P. aeruginosa* GN 17203 suşunda bulunmasıyla konjugatif bir plazmidle taşınan MBL geni olarak tanımlanmıştır [120]. Bu izolatın imipenem MİK değeri 50 µg/ml olarak tesbit edilmiş ve geniş spektrumlu sefalosporinlere de (örneğin seftazidim MIC >400 µg/ml) dirençli olduğu bildirilmiştir. Japonya'da 1991 yılında üriner sistem enfeksiyonlu hastadan izole edilen *Serratia marcescens* Tn9106 suşunda birebir aynı gen bulunmuştur [121]. Daha sonra Japonya'nın çeşitli bölgelerinden aynı geni taşıyan farklı izolatlar bildirilmiştir. Saptanan tüm enzimlerin aynı aminoasit yapısına sahip olduğu belirlenmiş ve beta-laktam ajanlarla birlikte imipenemi hidrolize etme özelliğinden dolayı bu enzime IMP-1 adı verilmiştir. Bu IMP-1 enzimi klas 3 integron üzerinde ve 120 kb büyüklüğünde bir plazmidde bulunur [122].

Shigella flexneri, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* izolatlarında MBL enzimi varlığı araştırılırken Japonya'da IMP-1'in 3 minör varyantı, IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tanımlanmıştır. Genetik ve kinetik çalışmalarda 169'uncu pozisyondaki serin yerine glisin geçmesinin penisiline karşı aktivitede bir azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. IMP-6'da izlenen bu aynı amino asit değişikliği, sadece penisilin G ve piperasiline karşı düşük aktivite göstermemiş, aynı zamanda, IMP-1'in aksine, imipenemle kıyaslandığında daha yüksek seviyede meropenem hidrolizi göstermiştir [123].

VIM “Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase” kazanılan MBL’ların ikinci dominant grubunu oluşturan enzimlerdir. VIM 1 ilk olarak 1997 yılında İtalya’da bir *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolatın imipenem için MIC değeri >128µg/ml iken ayrıca piperasilin, seftazidim, meropenem ve aztreonam gibi beta-laktamlara da dirençli bulunmuştur. IMP genlerinde olduğu gibi, VIM 1 geni de klas 1 integronlara gen kaseti olarak bütünleşmiştir. Bu integron VIM-1 gen kasetine ek olarak, klas 1 integronlarda tipik olan integrase geni ve aminoglikozidlere direnci kodlayan aacA4 gen kasetini taşır [124]. Ek olarak, VIM 1 İtalya’da nozokomiyal enfeksiyon kaynağı olup, *Pseudomonas putida* izolatlarında da tespit edilmesi çevresel izolatların MBL’ların kaynağı ya da en azından vektörleri olduğu görüşünü desteklemiştir [125]. VIM 1 ayrıca Yunanistan’da *E. coli* ve birkaç *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir [126]. VIM 2 ilk olarak Fransa’da 1996 yılında nötropenik bir hastanın kan kültüründe *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır [127]. Bu izolat, seftazidim, sefepim ve imipenem gibi birçok beta-laktama dirençli iken aztreonama duyarlı bulunmuştur. VIM 2 amino asit dizilimi VIM 1’e %90 oranında benzerdir ve bir gen kaseti tarafından kodlanmıştır [128]. Daha sonra Marsilya-Fransa’da 1995-1999 yılları arasında 10 ayrı VIM 2 pozitif *P. aeruginosa* izolatı tanımlanmıştır. Bu izolatlar aynı genotipik paterne sahiptir, ancak VIM 2 geni taşıyan klas 1 integronlar büyüklük ve yapı bakımından değişiklik göstermektedirler [129]. VIM 1’den 5 amino asit değişikliği ile ayrılan VIM 5 ise, ilk olarak Ankara- Türkiye’de *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir [130]. VIM 5’in tanımlanması *P. aeruginosa* izolatı aztreonam dahil bütün beta-laktamlara dirençli bulunmuştur [131, 132].

SPM 1 “Sao Paulo MBL” 1997 yılında Brezilya Sao Paulo’da bir *P. aeruginosa* klinik izolatı, SENTRY araştırma programının bir parçası olarak tanımlanmış ve SPM 1 olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı gösterilmiştir [133]. İzolatın, kolistin dışında standart bütün GN bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM 1, beta-laktamlardan penisilin, ampisilin, piperasilin, karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızlı hidrolize etme yeteneğine sahipken enzimin sefalosporinlere afinitesi daha fazladır. SPM 1’in dizilimi diğer MBL’larla karşılaştırıldığında, en fazla benzerlik IMP 1 %35.5 oranında bulunmuştur. IMP ve VIM benzeri enzimler transpozon ya da integronlar içinde yer alırken SPM 1 almamaktadır. [133, 134]. SPM 1 ayrıca, IMP 1 ve VIM 1 gibi klavulanik asit ya da aztreonamı hidrolize etmez [135].

GIM 1 “German imipenemase” 2002 yılında Almanya Dusseldorf’da farklı tıp merkezlerinden ve hastalardan izole edilen beş *P. aeruginosa* izolatında GIM 1 diye adlandırılan, sınıf B’de yer alan yeni bir beta-laktamaz olarak gösterilmiştir. Sadece

polimiksin B'ye duyarlı bu izolatların, IPM ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. MBL'ların çoğunda olduğu gibi (SPM 1 enzimi dışında) GIM 1, 45 kb'lık küçük bir plazmidde taşınan klas 1 integronda bulunur. Bu integron içerisinde ayrıca iki aminoglikozid direnç genleri (aaaA4 ve aadA1) ve bir beta-laktamaz geni (OXA 2) gibi üç tane daha direnç gen kaseti de bulunmaktadır [75, 107].

SIM Kazanılmış MBL'ların son ailesi Kore'den tanımlanmıştır. SIM 1 amino asit benzerliğiyle IMP ailesine en yakın (% 69) enzimdir (140). SPM, GIM ve SIM MBL'larının ilk keşiflerinden bu yana buldukları ülkelerin dışına yayılmamışlardır. Ancak VIM ve IMP dünya çapında tespit edilmeye devam etmektedir [79].

NDM 1 "New Delhi metallo-beta-laktamaz" Yeni bir MBL geni NDM 1'i taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları ilk olarak 2009 yılında *K. pneumoniae* kaynaklı bir enfeksiyon sebebiyle hospitalize edilmiş bir hastada Hindistan'da tanımlanmıştır [136]. NDM 1 plazmidle kodlanır ve karbapenemlere %90'ın üzerinde direnç gösterebilir. *E. coli* ve *Klebsiella* türleri dışında *C. freundii*, *Morganella morganii* ve *E.cloacae* gibi enterobakterilerin diğer üyelerinde de bildirilmiştir [137, 138].

2.6.3. Sınıf D Serin Karbapenemazlar; OXA beta-laktamazlar

OXA "Oxacillin-hidroliyzing" beta-laktamazlar en sık plazmidle kodlanan beta-laktamaz ailelerinden birini temsil etmektedirler. Bunlar genel olarak klavulanik asit ve EDTA ile iyi inhibe olmazlar ve amino asit dizilerinin büyük oranda değişken olduğu bilinir [79].

Oksasilinaz tipi beta-laktamazların kaynağının, doğada bulunan karbapenem benzeri doğal ürünler sentezleyen, toprakta yaşayan *Streptomyces cattleya*'ya karşı bakterilerde doğal direnç olarak kromozomal genler şeklinde ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Sınıf D OXA beta-laktamazların moleküler ayrımı yapıldığında diğer serin beta-laktamazlardan farklı bir sınıfta yer alırlar. Sınıf D beta-laktamazlar izoksazolil penisilin olan oksasilini diğer penisilinlerden daha hızlı hidrolize ettikleri için oksasilinazlar diye isimlendirilirler. Üç tane çok iyi korunmuş aktif bölgeleri bulunur. Birinci eleman bir tetrattır. Ser⁷⁰-X-X-lizin şeklinde gösterilir. X burada bir rezidü olabilir. Aktif bölgesinde serin aminoasidi bulunur. İkinci eleman Ser¹¹⁸-X-Val/Ile'dir. Bu da sınıf A beta-laktamaz Ser-Asp-Asn motifi ve AmpC beta-laktamazdaki Tyr-Ala/Ser-Asn motifinin eşdeğeridir. Sınıf D beta-laktamazdaki diğer iyi korunmuş motifler ise Tyr/Phe¹⁴⁴-Gly-Asn triadı ile Trp²³²-X-X-Gly tetrattır [83].

OXA tipi karbapenemazların substrat özgüllükleri geniştir. Penisilinleri (benzil penisilin, ampisilin, piperasilin, tikarsilin) ve dar spektrumlu sefalosporinleri (sefalotin ve sefaloridin) etkili bir şekilde hidrolize ederken, geniş spektrumlu beta-laktamazları (seftazidim, sefotaksim) ve aztreonamı çok az hidrolize eder ya da hiç hidrolize etmezler [83].

Klinik örneklerden izole edilen oksasilineazlar plazmidlerde bulunur. OXA tipi karbapenemazlardan ise *A. baumannii*'deki OXA 23, OXA 40, OXA 58 geni ve *K. pneumoniae*'daki OXA 48 geni plazmid üzerinde bulunur. Ancak bu genlerden hiçbiri gen kasetinin içerisinde bulunmaz. Buna karşın bu genler insersion sekansları (IS) ile ilişkili bulunmuştur [83, 139].

OXA 11, OXA 10'un ilk geniş spektrumlu türevi (önceden PSE-2 olarak bilinmektedir) olarak 1993'te tanımlanmıştır. Geniş spektrumlu türevler OXA 11, OXA 15, OXA-18 ve OXA-45'nin penisilini hidroliz oranı %1 ile %1,15 arasındadır. [140]. Şu anda 102 benzersiz OXA sekansı belirlenmiş, bunların 9'u GSBL ve en az 37'si karbapenamaz olarak kabul edilmiştir.

İlk karbapenemaz aktivitesi olan OXA beta-laktamaz 1993'te Paton ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Enzim İskoçya'da bir hastadan 1985'te izole edilen çoklu dirençli *A. baumannii*'den elde edilmiştir. Biyokimyasal karakteri EDTA ve klavulanik asitle zayıf inhibe olan beta-laktamazlardır. İmipenem hidrolizi spektrofotometrik olarak ölçülememiş fakat mikrobiyolojik yöntemlerle kolayca belirlenmiştir. Bu enzim ARI-1 (imipeneme dirençli *Acinetobacter*) olarak tayin edilmiş, büyük bir plazmid üzerinde olduğu gösterilmiş ve daha sonra OXA 23 olarak isimlendirilmiştir [141].

OXA karbapenemazların büyük çoğunluğu fırsatçı GN patojen *A. baumannii*'de tespit edilmiştir. 1998'den bu yana karbapenem hidroliz eden beta-laktamazlar dünyanın her yerinde klinik izolatlardan elde edilen *Acinetobacter*'lerden tespit edilmektedir [142].

İspanya ve Portekiz'de birbirlerinden sadece 2 amino asit farkı bulunan OXA 24 ve OXA 40'ın etkin olduğu *Acinetobacter* salgınları görülmüştür. Ayrıca OXA 40 ABD'de rapor edilen ilk karbapenem hidroliz eden oksasilineazdır. OXA 23 ve OXA 58 karbapenemazları üreten *Acinetobacter* suşları Irak ve Afganistan'da 2003 ve 2005 yılları arasında hizmet veren askeri ve sivil personelde de çok sayıda enfeksiyonlara sebep olmuştur [143].

En son sayımda amino asit homolojilerine göre 9 majör OXA karbapenemaz alt grubu belirlenmiştir [76, 83, 144].

Alt grup 1, 2 ve 3 sırasıyla OXA 23, OXA 24 ve OXA 51 sekansları kaynaklıdır. OXA 51 benzeri enzimler test edilen bütün *A. baumannii* suşlarında bulunmuştur ve bu türlerin subpopulasyonunda kromozomlarda doğal olarak bulunan bir komponent olduğu

düşünülmektedir. OXA 58 diğer OXA ailesi üyeleriyle %50'nin altında benzerlik gösterir. Tek başına grup 4' ü oluşturur ve özellikle Fransa, İtalya, Romanya, Yunanistan, Türkiye, Arjantin ve Kuveyt'ten izole edilen *Acinetobacter spp.*' de bulunmuştur. OXA 55 ve OXA SHE'nin her ikisinde *Shewanella algea*'dan izole edilmiştir ve 5. grubu oluşturmaktadır. OXA 48 enzimi, OXA 54 ve *Shewanella spp.*'nin çevresel türlerinde bulunan oksasilineazlarla birlikte 6. grubu oluşturmaktadır [76, 145, 146]. Dünya çapında OXA oluşturan *Acinetobacter* suşlarında ciddi bir artış görülmesine rağmen OXA 48 ilk defa Türkiye'de bir *K. pneumoniae* izolatında bulunmuştur [76].

P. aeruginosa'da bulunan OXA 50 benzeri enzimler 7. grubu oluşturmaktadır ve aralarında pox-B enzimleri adı verilen bir enzim grubu da bulunmaktadır. Pox-B oksasilineazların *P. aeruginosa*'nın birçok suşunda kromozomal olarak bulunduğu gösterilmiştir (test edilen 70 suşun 40'ında bulunmuştur) ve bu türlerde doğal olarak bulunan beta-laktam direncinin bir parçası olabileceği düşünülmektedir. Ancak tüm suşlarda eksprese olmayabilir ve karbapenem direnci (imipenem MIC ≤ 1 'in altında) ortaya çıkarmayabilirler [147]. Türe özgü OXA enzimleri altgrup-8 de yer alan OXA 60 *Ralstonia pickettii*'nin genomunun doğal bir komponentidir. Alt grup-9'a ait OXA 62 *Pandoreae pneumonosa*'nın türe özgü oksasilineazı olarak tanımlanmıştır [148].

OXA beta-laktamazların amino asit sekanslarında geniş bir oranda varyasyonlar bulunmaktadır. Karbapenemi hidroliz aktivitesi bulunan gruplar arasında % 40- 70 arası amino asit benzerlikleri bulunduğu gözlenmiştir. Karbapenem hidroliz aktivitesi bulunmayan OXA beta-laktamazlarda ise amino asit benzerliklerinin %18'e kadar azaldığı görülmüştür. OXA beta-laktamazların moleküler yapıları DBL sayılandırma sistemi ile OXA 1, OXA 58 ile karşılaştırılmıştır. [149]. DBL sayılandırma sistemi; sınıf A enzimlerin aktif bölgelerinde bulunan benzer motiflerin tanımlanmasına dayanan bir yöntemdir. Katalitik serin rezidüleri S-T-F-K tetratında 70 ve 73'e kadar olan pozisyonlarda bulunmaktadır. Sınıf A, sınıf D enzimleri ve PBP'lerde serin ve lizinin lokalizasyonu korunmuştur [150].

OXA beta-laktamazın katalitik mekanizması diğer serin karbapenemazlar ile benzer özelliklere sahiptir. Substrat ve enzim, katalitik serin bölgesindeki kovalent açıl bağı bir ara geçiş formu oluşturur. Hemen sonrasında diaçillenecek beta-laktam halkasındaki C-N bağlantısının hidrolizi ile inaktif antibiyotiğe dönüşür. Ayrıca CO₂; OXA enzimlerin bazılarının kinetiklerini sınıf D enzimlerindeki lizin 70'in karboksilasyonu sonucu etkileyebilir. Bu karbamat katalitik serin yan zincirini aktive ederek açıl ara formun oluşmasını sağlar [151, 152]. Bu modifikasyonun oluşmasını garanti etmek için bazı araştırmacılar reaksiyonlarına 10 mM sodyum bikarbonat (NaHCO₃) eklemiştir [153].

OXA enzimlerinin düşük verimlerinden dolayı saflaştırılması güçtür ve biokimyasal olarak özelliklerinin belirlenmesi, düşük hidroliz oranları ve bazı substratlar için bifazik kinetikleri nedeni ile oldukça güçtür [83].

Biyokimyasal özellikleri belirlenmiş OXA karbapenemazların penisilin, bazı sefalosporin ve imipenem karşı hidrolitik aktivitesi ölçülebilir. Genel olarak imipenem hidrolizi (ki bu meropenem hidrolizinden daha hızlıdır) bunlarda yavaştır. Sınıf D oksasilinaz ailesinin de karbapenem hidrolizi zayıftır.

Karbapenem direnci, OXA tipi karbapenemazların yanı sıra bununla kombine porin kaybı veya AdeABL efluks pompasının aşırı ekspresyonu gibi sekonder direnç mekanizmalarına da bağlıdır [79, 83].

2.6.3.1. OXA 48 beta-laktamazı

OXA 48 doğadaki rezervuarlarının su kaynaklı bir GN olan *Shewanella oneidensis* olduğu gösterilmiştir. *Enterobacteriaceae*'da ilk defa kromozom tarafından kodlanan oksasilinaz, *P. mirabilis*' te OXA 23 geninin bulunmasıyla ortaya konmuştur. Daha sonra OXA 48 geni de ilk defa 2001 yılında Türkiye'de *K. pneumoniae* izolatında bulunmuştur [145, 154]. Bu suşun test edilen bütün beta-laktamlara, aminoglikozidlere, kloramfenikol, nalidiksik asit, rifampin ve sülfonamidlere dirençli olduğu saptanmıştır [76].

Plazmidle kodlanan OXA 48 geni IS1999'un hemen yanında bulunur. Bu da insersion sekansının (IS) promotör sekansları oluşturmasının yanı sıra bu beta-laktamaz geninin mobilizasyon işleminde de bir rolü sahip olduğunu düşündürmektedir ve bir IS elemanı ile oksasilinaz geni arasındaki ilişkiyi gösteren ilk rapordur [76].

OXA 48 beta-laktamazın biyokimyasal özellikleri: Yapılan çalışmalarda OXA 48 beta-laktamazın dar bir hidroliz profili olduğu, bununda penisilinleri, sefalotin, imipenem ve daha düşük bir oranda da sefotaksim, seftazidim, sefepim ve sefpiromu içerdiği gösterilmiştir. OXA 48'in imipenem için olan katalitik aktivitesinin OXA 40'tan 10 kat, KPC 1'den üç kat daha fazla olduğu raporlanmıştır [76, 138]. Meropenem hidrolizinin ise diğer OXA (OXA 24, OXA 25, OXA 26 gibi) beta-laktamazlarda olduğu gibi çok düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir [76, 155].

Oksasilin ise örneğin OXA 40'a göre anlamlı derecede OXA 48 ile hidroliz edilmektedir [139]. OXA 48 klavulonik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile zayıf bir şekilde inhibe olmaktadır. Ancak diğer oksasilinazlarda sık görülen bir özellik olarak OXA 48'in de NaCl ile inhibisyon gösterdiği gözlemlenmiştir [76, 139].

OXA 48 beta-laktamazının diğer karbapenem hidrolize eden oksasilinazlardan çok daha yüksek bir ölçüde, neredeyse KPC 1 enzimine yakın bir seviyede karbapenemleri hidrolize ettiği saptanmıştır [76, 92].

OXA 23, OXA 27, OXA 40'tan farklı olarak OXA 48 144'ten 146. aminoasit pozisyonunda F-G-N motifi yerine klasik oksasilinaz Y-G-N motifini içerir. Bu da 144. pozisyonda karbapenemlere hidrolitik aktivite göstermek için fenilalanin rezidüsüne gerek olmadığını vurgulamaktadır. OXA 48'in NaCl ile inhibisyonu bu 144. pozisyonda bulunan tirozin aminoasitinin inhibisyonuna bağlıdır. Diğer oksasilinazlarda burada fenilalanin rezidüsü bulunduğu için NaCl inhibisyonuna dirençlidirler [76, 139]. Üreidopenisilinlere (piperasilin) duyarlılık değişkendir. Sadece OXA 40 ve OXA 48 bu ilaca direnç sağlar [83].

OXA 48 üreten *K. pneumoniae* karbapenemlere yüksek düzeyde direnç sağlar. (MIC=64 mg/L) Bu hem OXA 48'in IS1999'a bağlı yüksek düzeyde üretimine hem de 36 kilo daltonluk porinin kaybına bağlı olarak gelişebilmektedir.

3. MATERYAL - METOD

Bu çalışmaya 01/07/2012-01/07/2013 tarihleri arasında İstanbul Bilim Üniversitesi Avrupa Florence Nightingale Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 43 adet karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu dahil edilmiştir. Her hasta için tek suş çalışmaya alınmıştır.

Suşların Saklanması: Vitek-2 otomatize sistemi ile karbapenem dirençli olarak tesbit edilen *Enterobacteriaceae* suşları, boncuklu bakteri saklama tüpleri içerisinde süspanse edilerek -40°C de muhafaza edilmiştir.

3.1. FENOTİPİK TESTLER

Çalışmada ertapenem, imipenem ve/veya meropenem dirençli veya azalmış duyarlılığı olan *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* suşlarının tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları firmanın önerilerine uygun olarak Vitek-2 (bioMérieux-Fransa) otomatize sistemiyle yapılmıştır. Suşların imipenem, meropenem ve ertapenem MIC değerleri ek olarak E-test ile belirlenmiştir. Metallo-beta-laktamaz üretimi imipenem ve imipenem/EDTA

kullanılan E test stripleri (bioMérieux) ile çalışılmıştır. Karbapenemaz üretimi ise Modifiye Hodge Testi ile çalışılmıştır.

3.1.1. Vitek-2 Sistemi ile Tür Tayini ve Antibiyotik Duyarlılık Testi

Vitek-2 sistemi (bioMérieux, Fransa) otomatize bir sistem olup bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılır. Sistem, tanımlama işlemini içerdiği biyokimyasal testlerle gerçekleştirmektedir. Gram negatif bakteri tanımlanması için GN kartları ve antibiyotik duyarlılıklarının tayini için AST-261 kartları kullanılmıştır.

3.1.2. E test yöntemi

Bu yöntem ile imipenem, meropenem, ertapenem E test için üretici firmanın önerileri doğrultusunda elde edilen saf bakteri kolonilerinden Mueller Hinton buyyonunda 0,5 McFarland Standard bulanıklığına eş süspansiyonlar elde edilmiş ve süspansiyon steril pamuklu eküvyon çubuğu yardımı ile Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. E test şeritleri yerleştirilmeden önce 15-20 dakika nemin emilmesi için beklenmiştir. Pens yardımı ile antibiyotiklerin E test şeritleri, besiyeri plaklarına yerleştirilmiştir. Aerobik ortamda, normal atmosferde, 35 °C'de ve 16-20 saat inkübasyon sonucunda elips şeklindeki inhibisyon zonunun şeritle kesiştiği nokta sayısal MIC değeri olarak kabul edilmiştir. Her bir antibiyotığın MIC değerleri üretici firma ve CLSI önerilerine uygun olarak ölçülmüştür. Sonuçlar CLSI'nın sınır değerleri esas alınarak değerlendirilmiştir [36].

3.1.3. MBL E test (IPM/IPM+EDTA E-test)

Çalışmamızda kullandığımız E-test ticari olarak hazır elde edilen ve MBL enziminin fenotipik olarak tayininde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir testtir. Bir tarafında 4–256 µg/ml imipenem, diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 1–64 µg/ml imipenem içeren E test MBL şeritleri kullanılmıştır. Test edilecek bakteri isolatlarının 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile Mueller-Hinton agar plaklarına yayılmıştır. MBL E test stripleri plak üzerine yerleştirilmiştir. Etüvde 35 °C'de 16–20 saat inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. İmipenem+EDTA MIC değeri ve imipenem MIC değeri not edilip IPM/IPM+EDTA MIC değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri izolatu olarak değerlendirilmiştir [156].

3.1.4. Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testinde kullanılmak üzere imipeneme duyarlı olan *E.coli* ATCC 25922 standart suşu taze pasajlarından elde edilmiştir. 0,5 McFarland bulanıklığında

hazırlanan süspansiyonlar 1:10 sulandırılarak Mueller Hinton agar plaklarına homojen olarak yayılmıştır. 15-20 dakika nemin emilmesi için beklenip plağın ortasına ertapenem (10µg) diski yerleştirilmiştir. Test edilecek olan bakterilerin kanlı agardaki taze kültürlerinden steril eküvyon yardımıyla bakteri kolonileri toplanmış ve ertapenem diskinin bir kenarından başlayarak besiyeri kenarına doğru yoğun bakteri ekimi yapılmıştır. Plaklar etüvde 35 °C’de 16–24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Test sonuçları ertapenem diskinin etrafındaki inhibisyon zonunun, test edilen mikroorganizmanın bulunduğu çizginin etrafında *E.coli* ATCC 25922 üremesi sonucu yonca yaprağı şeklini alması pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.2. GENOTİPİK TESTLER

Moleküler çalışmalar için toplanan suşlarda karbapenemaz üretimine sebep olan genlerin araştırılmasında Multipleks PCR (hyplex® SuperBug ID) yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1. Multipleks PCR

Kullandığımız hyplex® SuperBug ID sistemi; çeşitli karbapenemaz üreten bakterilerin saptanmasında; tanımlanan tüm MBL’lardan VIM, IMP ve NDM 1, OXA 48 ve KPC’ yi saptayabilmektedir. Bu PCR modülü ile amplifiye edilen genetik materyal daha sonra hyplex® SuperBug ID hibridizasyon modüllerinde spesifik oligonükleotid problemlerle geri dönüşümlü hibridizasyon yapılarak gözle görülür hale getirilir.

DNA Ekstraksiyonu: DNA ekstraksiyonu mikroorganizmaları ısı, deterjan ve mekanik etkilerle lizise uğratmayı amaçlayan ‘AxyPrep’ (Axygen Biosciences, ABD) mikrobiyal DNA izolasyon kitiyle yapılmıştır. Kit oda ısısında saklanmıştır.

Bu işlem sırasında uygulanan basamaklar:

- Genotiplendirmeye alınacak olan bakteriler sıvı besiyerinde 24 saat 37°C’de üretilmiştir.
- 1×10^9 bakteri 2 ml ‘lik Mikrofuge tüpüne koyularak 30 sn 12.000 x g ‘de santirfüj edilip üst kısım atılarak bakteriyel pellet RNase A içeren 150 µl Buffer ile tekrar süspanse edilmiştir.
- 20 µl lizozim eklenerek iyice karıştırılıp 5 dk oda ısısında bekletilmiştir.
- 30 µl 0.25 M EDTA eklenerek iyice karıştırılarak 5 dk buzda inkübe edilmiştir.
- 450 µl Buffer G-B eklenerek 15 sn vortekslenip sonrasında 10 dk 65°C ‘lik sıcak su banyosunda bekletilmiştir.

- 4°C soğutulan Buffer DV 'den 1 ml ve 400 µl Buffer G-B eklenip iyice karıştırılmış sonrasında 12.000 x g 'de 2 dk santirfuj edilmiştir.
- Ara tabakaya zarar vermeden üst tabaka aspire edilerek atılmıştır.
- Geriye kalan ara ve alt faza 4°C soğutulan Buffer DV eklenip homojen olana kadar karıştırılıp 12.000 x g 'de 2 dk santirfuj edilmiştir.
- Renkli üst faz atılarak alt faz; içine bir spin filtre yerleştirilen 2 ml 'lik Microfuge tüpe alınmıştır ve 12.000 x g 'de 1 dk santirfuj edilmiştir.
- Spin filtre çıkarılarak 400 µl Buffer BV eklenerek iyice karıştırılmıştır.
- 2 ml'lik Microfuge tüpe bir Miniprep yerleştirilerek karışım buna transfer edilip 12.000 x g'de 1 dk santirfuj edilmiştir.
- Çökelti dökülüp Miniprep tekrar 2 ml'lik Microfuge tüpe yerleştirilmiş sonrasında üzerine 500 µl Buffer W1 eklenip 12.000 x g 'de 1 dk santirfuj edilmiştir
- Çökelti dökülüp Miniprep tekrar 2 ml'lik Microfuge tüpe yerleştirilmiş sonrasında üzerine 700 µl Buffer W2 eklenip 12.000 x g'de 1 dk santirfuj edilmiştir. Sonrasında bu işlem aynı şekilde tekrarlanmıştır.
- Çökelti dökülüp Miniprep tekrar 2 ml'lik Microfuge tüpe yerleştirilip 12.000 x g'de 1 dk santirfuj edilmiştir
- Miniprep 1.5 ml 'lik temiz Microfuge tüpe yerleştirilip DNA nın ayrışması için membranın merkezine 100-200 µl Eluent eklenip 1 dk oda sıcaklığında bekletilmiş sonrasında 12.000 x g'de 1 dk santirfuj edilmiştir.

Multiplex PCR Testin prensibi

Tek bir PCR reaksiyonunda değişik DNA bölgelerinin aynı anda spesifik amplifikasyonlarını sağlayan işaretlenmiş oligonükleotid primerler içerir. İlgili DNA'nın bulunması halinde VIM, IMP, NDM 1, KPC ve OXA 48 genlerinin spesifik amplifikasyon ürünleri sentezlenir.

Tek bir PCR sonucunda ortaya çıkan amplifikasyon ürünleri ısıyla denatüre edilerek elde edilmiş tek iplikli spesifik problemlerin üzerinde immobilize edildiği mikrotitre plaklarına eklenir. Daha sonra bir hibridizasyon bufferı kullanılarak karşılıklı sekansların hibridizasyonu sağlanır ve bunlar ELISA prensibi ile saptanır. Çeşitli zorlayıcı yıkama basamaklarından sonra peroksidaz konjugat eklenir, bu oligonükleotid proba bağlanan PCR ürününün işaretleyicisine spesifik olarak bağlanır, çeşitli yıkama basamaklarından sonra TMB substrat solüsyonu eklenerek bunun peroksidazla mavi renge dönüşmesi sağlanır. Reaksiyon stop

solüsyonuyla sonlandırılır sarı renk dönüşümü gözlenir pozitif sinyalin bulunması hyplex® SuperBug ID PCR ile spesifik DNA sekanslarında amplifikasyon olduğunu, dolayısıyla örnekte ilgili genin bulunduğunu gösterir.

Bu amaçla aşağıdaki basamaklar uygulanmıştır:

Hazırlık aşaması: DNA ekstraksiyonu sonrası - 20 derecede muhafaza edilen örnekler, Washing buffer, TMB-Substrat solüsyonu, Stop solüsyonu, Mikrotitre plakları oda sıcaklığına getirilmiştir. 10x PCR Buffer dondurucudan çıkarılmıştır.

PCR çalışması:

- 0.2 ml'lik PCR tüpleri hazırlanmıştır.
- Master mix 2 ml'lik bir tüpe hazırlanmıştır.
- Her PCR tüpünde; 36 µl H₂O, 1 µl nükleotid mix, 2 µl primer mix, 5 µl PCR buffer, 1 µl Tth-polimeraz olacak şekilde pozitif ve negatif kontroller de hesaplanarak bu maddelerle master mix hazırlanmış ve tüplere dağıtılmıştır.
- Plastik taşıyıcılara farklı problemler için ayrı renkte olan test plateleri yerleştirilmiştir
- Her kuyucuğa örneklerden (DNA) 5 µl, pozitif ve negatif kontrolden de 5 µl ile 45 µl master mix karıştırılmıştır.
- 50 °C 30 dk inkübe edilmiştir.
- Daha sonra 50 °C'de beklettiğimiz stringent yıkama solüsyonundan her kuyucuğa 200 µl konularak 3 kez yıkama işlemi yapılmıştır.
- Peroksidaz konjugattan 100 µl kuyucuklara ilave edilerek oda sıcaklığında 30 dk inkübe edilmiştir.
- Yıkama solüsyonundan her kuyucuğa 200 µl konularak tekrar 3 kez yıkanmıştır.
- Daha sonra TMB- substrat solüsyonundan 100 µl her bir kuyucuğa konularak oda sıcaklığında ve karanlıkta 15 dk inkübasyona bırakılmıştır
- Inkübasyon sonrası stop solüsyonundan 100 µl dağıtılmıştır
- Analiz için 450 nm dalga boyunda fotometrede değerlendirilmiştir..

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Verilerin tanımlayıcı istatistiklerinde ortalama, standart sapma, min-mak, oran ve frekans değerleri kullanılmıştır. Uyum analizinde kappa uyum testi kullanılmıştır. Analizlerde SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Bu çalışmada; 01/07/2012-01/07/2013 tarihleri arasında İstanbul Bilim Üniversitesi Avrupa Florence Nightingale Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına cerrahi yoğun bakım, dahili yoğun bakım, cerrahi kliniği, dahiliye kliniği ve kemik iliği transplantasyonu (KİT) servislerinden gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemlerden en az birine direnç ya da azalmış duyarlılık tespit edilmiş 43 adet *Enterobacteriaceae* izolatu dahil edilmiştir. Her hasta için tek suş çalışmaya alınmıştır.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gelen klinik örneklerden 43 suşun % 32.5 (14)'si cerrahi yoğun bakım servisinden elde edildi. Bunu sırasıyla dahili yoğun bakım servisi % 30.2 (13), dahiliye servisi % 18.6 (8), KİT servisi % 14 (6), cerrahi servisi % 4.7 (2) oranında izlemiştir. İzolatların kliniklere göre dağılımı Tablo 6'da görülmektedir.

Laboratuvarımıza gönderilen örneklerin dağılımı ise en yüksek oranda kan kültürü örneği % 25.6 (11 izolat) ve rektal sürüntü örneği % 25.6 (11 izolat) daha sonra sırasıyla idrar % 14 (6 izolat), batın içi mayi % 9.3 (4 izolat), balgam % 9.3 (4 izolat), trakeal aspirat % 7 (3 izolat), yara % 4.6 (2 izolat), bronkoalveolar lavaj (BAL) % 2.3 (1 izolat), plevra sıvısı % 2.3 (1 izolat) oranında tespit edilmiştir (Tablo 6).

Tablo 6: Materyal ve kliniklere göre dağılım

		n	%	Mortalite
Suşların İzole Edildiği Materyal Dağılımı	Kan	11	25,60	8
	Rektal	11	25,60	5
	İdrar	6	14	3
	Batın İçi Mayi	4	9,3	1
	Balgam	4	9,3	1
	Trakeal	3	7	3
	Yara	2	4,6	2
	Bal	1	2,3	1
	Plevra	1	2,3	1
Servis Dağılımı	CYB	14	32,5	9
	DBY	13	30,2	10
	Dahiliye	8	18,6	3
	KİT	6	14	3
	Cerrahi	2	4,7	0

CYB: Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesi, DYB: Dahili Yoğun Bakım Ünitesi, KİT: Kök Hücre Nakli

Hastaların 28' i (% 65.1) erkek, 15'i (% 34.9) kadın; yaş dağılımları 3-86 yıldır (ortalama 53.8 yıl). Hastaların takibinde 25 'i exitus olmuştur (Tablo 7).

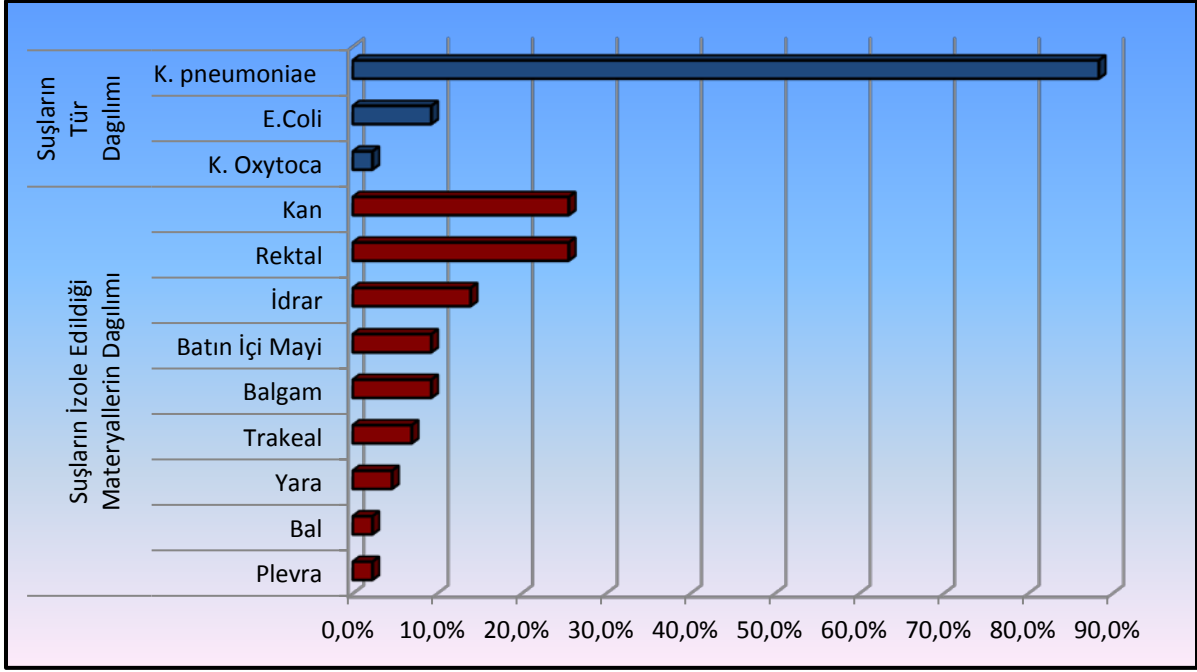
Tablo 7: Hastaların demografik özellikleri

	Kadın	%	Erkek	%	Ort.±s.s	Toplam (n)	%
Cinsiyet	15	34.9	28	65.1		43	
Yaş	59.5		50.4		53.8±19.4		
Organ nakli	5		14			19	44.1
Karaciğer nakli	3		7			10	52.6
KİT	2		4			6	31.5
Böbrek nakli			2			2	10.5
Kalp nakli			1			1	5.2
Mortalite							
Nakil	1		6			7	36.8
Toplam	9	20.9	16	37.2		25	58.1

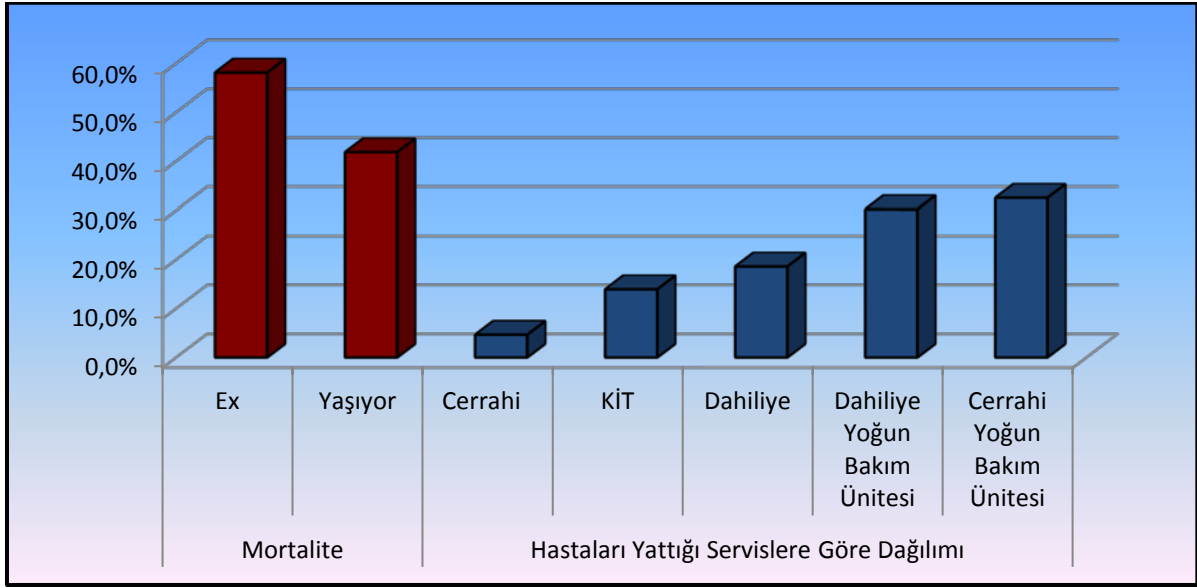
İzole edilen 43 suşun % 88.4 (38)'ü *K. pneumoniae*, % 9.3 (4)'ü *E.coli* ve % 2.3 (1)'ü *K.oxytoca* idi (Tablo 9).

Tablo 8: Etkenlerin dağılımı

<i>mikroorganizma</i>	n	%
<i>K.pneumoniae</i>	38	88.4
<i>E.coli</i>	4	9.3
<i>K.oxytoca</i>	1	2.3
<i>Toplam</i>	43	100



Şekil 4: Etken ve materyal dağılımı



Şekil 5: Mortalite ve servislere göre dağılım

Disk difüzyon yöntemi ile suşların tamamı ertapeneme dirençli bulundu. Suşların meropenem için % 95.3 (41)'ünde, imipenem için % 83.7 (36) direnç ya da azalmış duyarlılık saptandı.

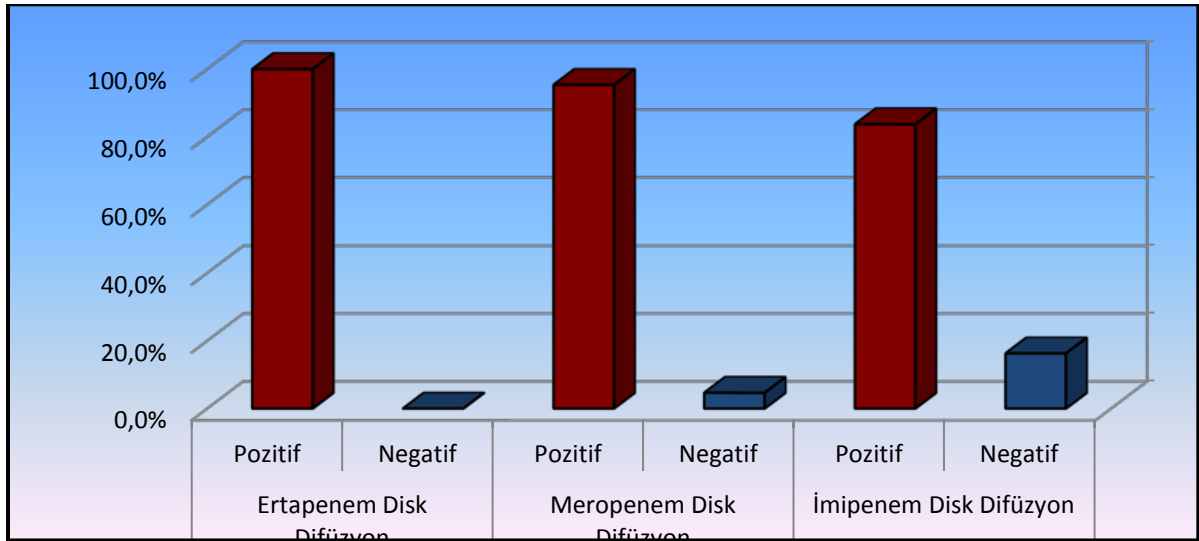
Vitek-2 AST-261 GN kartları ile izolatların imipenem (IMP), meropenem (MEM) ve ertapenem (ERT) için MIC değerleri belirlendi. Bu izolatların MIC değerleri aynı karbapenemler için ayrıca E test ile de denenmiştir.

E test ve Vitek-2 olmak üzere her iki yöntemle çalışılan 43 izolatta, karbapenemler içinde en yüksek direnç görülen karbapenem ERT (sırasıyla % 97.7 ve % 100 dirençli) olmuştur. Bunu (orta duyarlılar dirençli kabul edildiğinde) MEM (sırasıyla % 93 ve % 90.7 dirençli) ve IMP (sırasıyla % 79.1 ve % 88.4 dirençli) izlemiştir. Her iki yöntem ile belirlenen IMP, MEM ve ERT direnç yüzdeleri tablo 9'da görülmektedir.

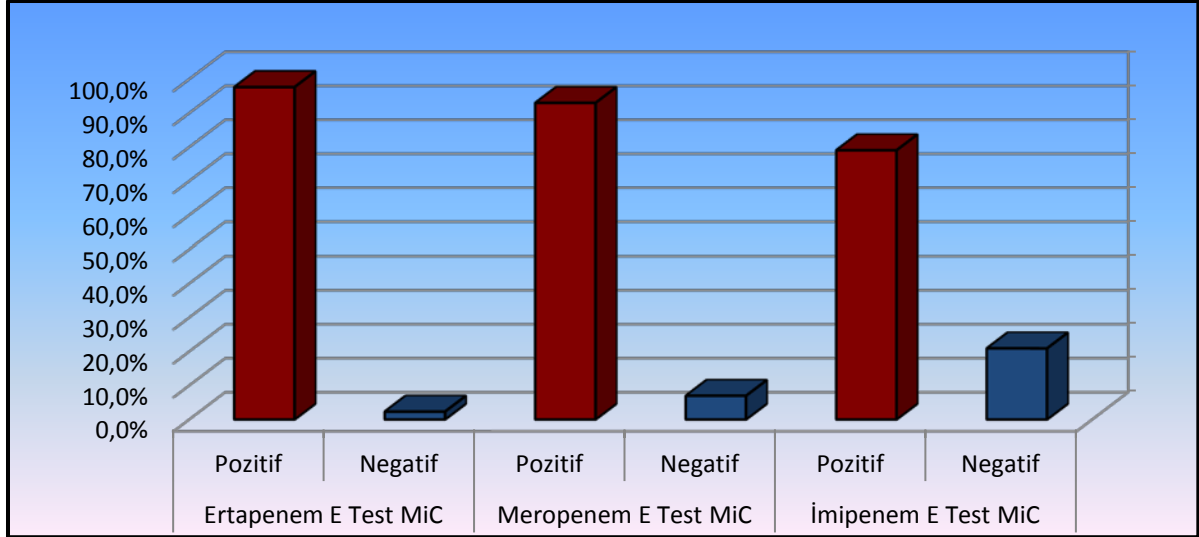
Tablo 9: Karbapenemlerin disk difüzyon, E test ve Vitek karşılaştırmaları

	DİSK DİFÜZYON				E TEST MIC				VİTEK MIC			
	Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif		Pozitif		Negatif	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
ETP	43	100	0	0	42	97,7	1	2,3	43	100	0	0
MEM	41	95.3	2	4.7	40	93	3	7	39	90,7	4	9,3
İMP	36	83.7	7	16.3	34	79,1	9	20,9	38	88,4	5	11,6

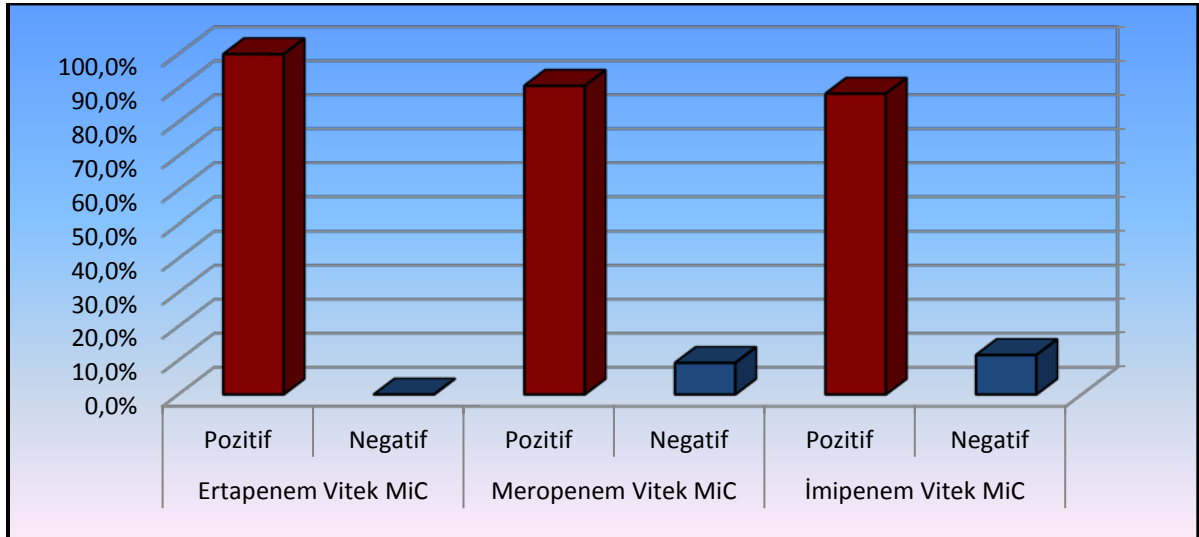
ETP: Ertapenem, MEM: Meropenem İMP: İmipenem



Şekil 6: Karbapenemlerin Disk Difüzyon yöntemine göre sonuçları



Şekil 7: Karbapenem E Test yöntemine göre MIC sonuçları

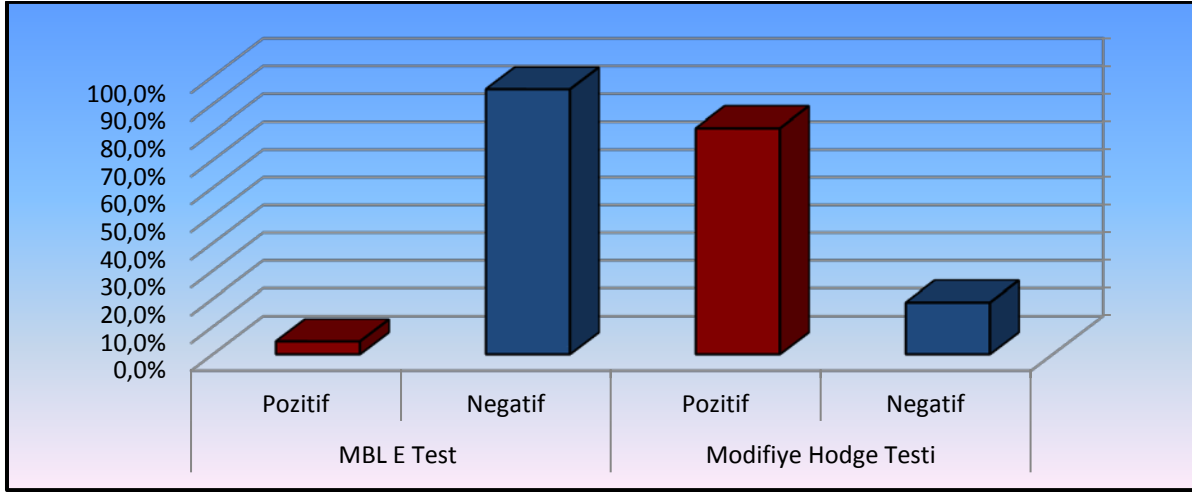


Şekil 8: Karbapenem Vitek Sistemine göre MIC sonuçları

Modifiye Hodge Testi çalışılan 43 suşun 35'inde (% 85) MHT'i pozitif bulundu. Çalışmamızda IMP/IMP+EDTA E-testi değerlendirilirken IMP/IMP+EDTA oranı ≥ 8 bulunan izolatlar MBL enzimi pozitif, < 8 bulunanlar ise MBL enzimi negatif olarak değerlendirildi. IMP/IMP+EDTA E-testi bakılan 43 izolattan 41'inde (% 95.3) MBL negatif, 2'sinde (% 4.7) ise MBL pozitif bulunmuştur. MBL E-test ile pozitif bulunan iki izolattan birinde NDM 1 direnç geni pozitif olarak bulunmuştur (Tablo10).

Tablo 10: Fenotipik testler

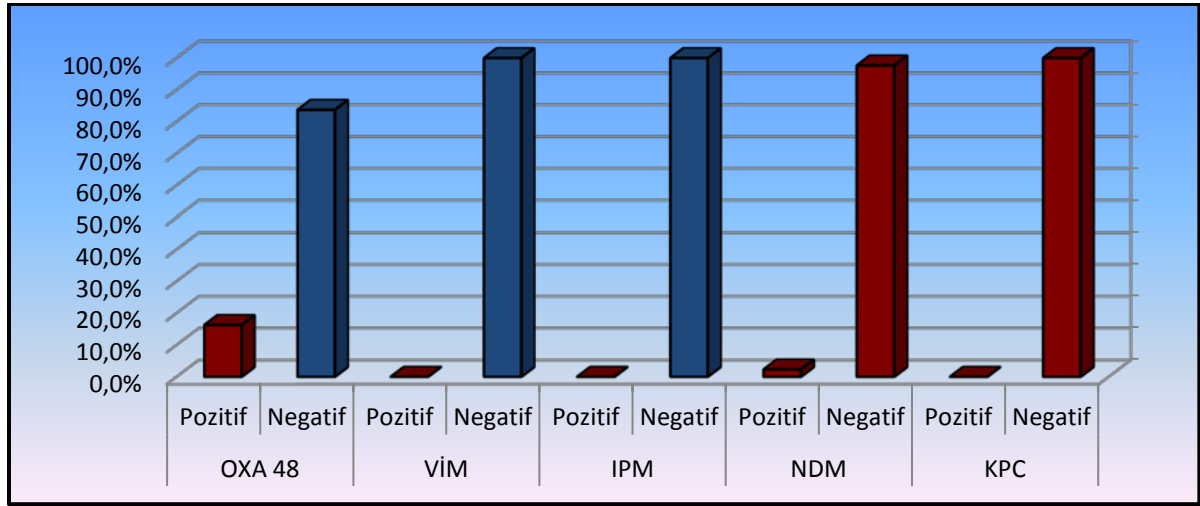
Fenotipik test		n	%
MBL E test	Pozitif	2	4.7
	Negatif	41	95.3
MHT	Pozitif	35	81.4
	Negatif	8	18.6



Şekil 9: Fenotipik Testler

Çalışmada Multiplex PCR ile değerlendirilen 43 izolatın % 16.3 (7)'ünde OXA 48 geni, %2.3 (1)'ünde NDM 1 pozitif saptanmıştır. Çalışmada VİM, İPM, KPC direnç genleri için pozitiflik saptanmamıştır (Tablo 11).

Tablo11: Multiplex PCR		n	%
OXA 48	Pozitif	7	16.3
	Negatif	36	83.7
VİM	Pozitif	0	0.0
	Negatif	43	100.0
IPM	Pozitif	0	0.0
	Negatif	43	100.0
NDM 1	Pozitif	1	2.3
	Negatif	42	97.7
KPC	Pozitif	0	0.0
	Negatif	43	100.0



Şekil 10: Multiplex PCR

OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem disk difüzyonu ve meropenem disk difüzyonu arasında uyum saptanmadı ($p \geq 0,05$). OXA 48 direnç geni pozitifliği ile imipenem disk difüzyonu arasında uyum saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 12).

OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem E test MIC, meropenem E test MIC, imipenem E test MIC arasında olmadığı saptandı ($p > 0,05$) (Tablo 12).

OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem Vitek MIC, meropenem Vitek MIC arasında uyum saptanmadı ($p \geq 0,05$). OXA 48 direnç geni pozitifliği ile imipenem Vitek MIC arasında uyum saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 12).

Tablo 12: Karbapenemlerin OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ilişkisi

	DİSK DİFÜZYON OXA 48					E TEST MIC OXA 48					VİTEK MIC OXA 48				
	Pozitif		Negatif		p	Pozitif		Negatif		p	Pozitif		Negatif		p
	Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif		Pozitif	Negatif	Pozitif	Negatif	
ETP	7	0	36	0	--	7	0	36	0	0.655	7	0	36	0	--
MEM	6	1	34	2	0.186	5	2	34	2	0.407	6	1	35	1	0.055
İMP	5	2	29	7	0.037	5	2	33	3	0.587	4	3	32	4	0.126

ETP: Ertapenem MEM: Meropenem İMP: İmipenem

Modifiye Hodge Testi pozitifliği ile OXA 48 direnç geni pozitifliği arasında uyum mevcuttur ($p < 0,05$) (Tablo 13).

Tablo 13: MHT ile OXA 48 direnç geni pozitifliği ilişkisi

		OXA 48				p
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
MHT	Pozitif	3	43	32	88,9	0,004
	Negatif	4	57	4	11,1	

MBL E test ile NDM-1 arasında Kappa uyum analizi testi ile anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0,05$) (Tablo 14).

Tablo 14: MBL E test ile NDM 1 direnç geni ilişkisi

		NDM 1				p
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
MBL	Pozitif	1	100	1	2,4	0,000
	Negatif	0	0	41	97,6	

Ertapenem disk difüzyon ile dirençli saptanan 43 suşun E test yöntemi ile belirlenen MIC düzeylerine göre %97,7 oranında dirençli bulunurken Vitek-2 yöntemine göre %100 oranında dirençli bulunmuştur (Tablo 15).

Tablo 15: Ertapenem Disk Difüzyon ile MIC değerleri uyumu

		Ertapenem Disk Difüzyon				P
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
Ertapenem E Test MIC	Pozitif	42	97,7	0	0,0	-
	Negatif	1	2,3	0	0,0	
Ertapenem Vitec MIC	Pozitif	43	100,0	0	0,0	-
	Negatif	0	0,0	0	0,0	

Tablo 16: Ertapenem E Test ile Vitek uyumu

		Ertapenem Vitec MIC				P
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
Ertapenem E Test MIC	Pozitif	42	97,7	0	0,0	-
	Negatif	1	2,3	0	0,0	

Meropenem disk difüzyonu ile meropenem E test MIC ve Meropenem Vitek MIC arasında uyum saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 17). Meropenem E test MIC ile Meropenem Vitek MIC arasında uyum saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 18).

Tablo 17: MEM disk difüzyonu ile MEM E test, Vitek MIC uyumu

		Meropenem Disk Difüzyon				P
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
Meropenem E Test MIC	Pozitif	39	95,1	1	50,0	0,014
	Negatif	2	4,9	1	50,0	
Meropenem Vitec MIC	Pozitif	38	92,7	1	50,0	0,042
	Negatif	3	7,3	1	50,0	

Tablo 18: Meropenem E Test ile Vitek uyumu

		Meropenem Vitek MIC				P
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
Meropenem E Test MIC	Pozitif	37	94,9	3	75,0	0,137
	Negatif	2	5,1	1	25,0	

İmipenem disk difüzyonu ile İmipenem E test MIC ve İmipenem Vitek MIC arasında uyum saptandı ($p < 0,05$) (Tablo 19). İmipenem E test MIC ile İmipenem Vitek MIC arasında uyum saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 20).

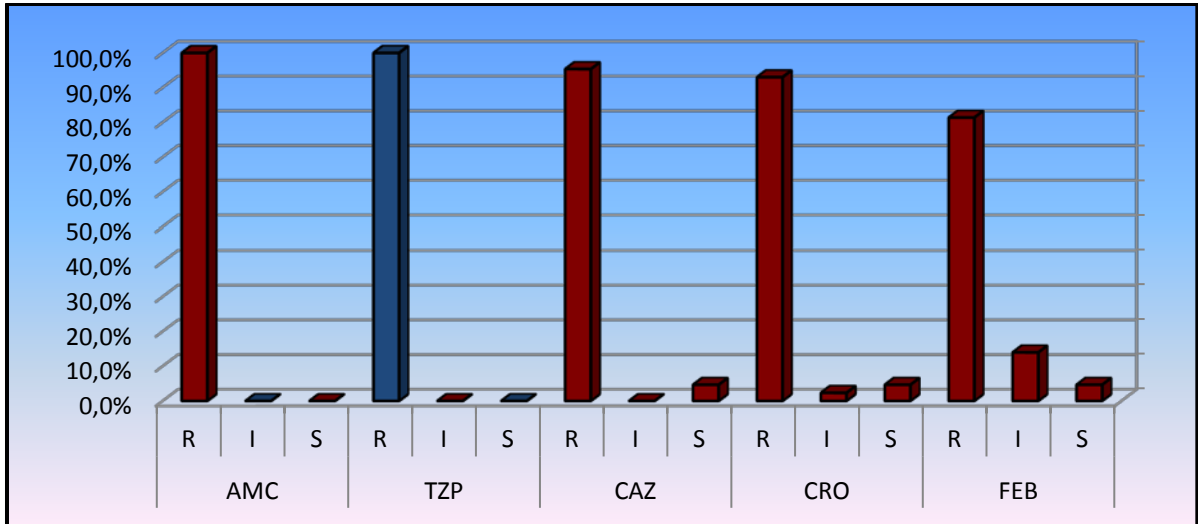
Tablo 19: İMP disk difüzyonu ile İMP E test, Vitek MIC uyumu

		İmipenem Disk Difüzyon				P
		Pozitif		Negatif		
		n	%	n	%	
İmipenem E Test MIC	Pozitif	31	86,1	3	42,9	0,010
	Negatif	5	13,9	4	57,1	
İmipenem Vitec MIC	Pozitif	35	97,2	3	42,9	0,000
	Negatif	1	2,8	4	57,1	

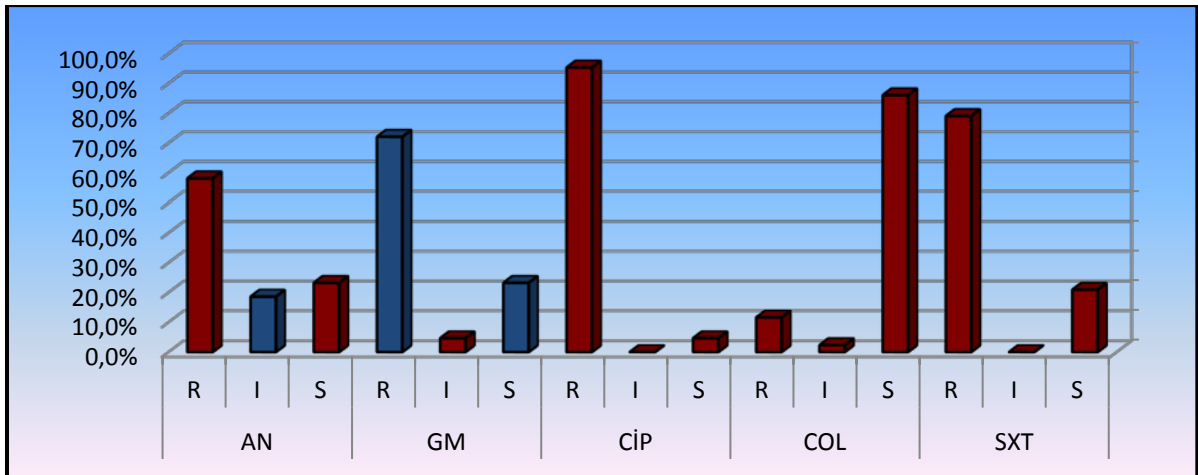
Tablo 20: İmipenem E Test ile Vitek uyumu

		İmipenem Vitek MIC				P
		Pozitif		Negatif		
		N	%	n	%	
İmipenem E Test MIC	Pozitif	31	81,6	3	60,0	0,265
	Negatif	7	18,4	2	40,0	

Vitek 2 ile araştırılan duyarlılık paterninde 43 suşun tamamı *amoksisilin*-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktama karşı dirençli saptanmıştır. Seftazidim direnci % 95.3 (43) oranında iken, seftriakson % 93 (41) suşta dirençli, % 2.3 (1) suşta orta duyarlı, % 4.7 (2) suşta duyarlı olarak saptanmıştır. Kırk üç izolatin % 81.4 (35)'ü sefepime dirençli iken % 14 (6)'ü orta duyarlı, % 4.7 (2)'si duyarlı saptanmıştır. Aminoglikozidlerden amikasin ve gentamisin için sırası ile direnç % 58.1 (25), % 72.1 (31), orta duyarlı % 18.6 (8), % 4.7 (2) ve duyarlı % 23.3 (10), % 23.3 (10) olarak saptanmıştır. Siprofloksasin 43 izolatin % 95.3 (41) dirençli iken % 4.7 (2) duyarlı saptanmıştır. Ttrimetoprim-sulfametozol % 79.1 (34) suşta dirençli % 20.9 (9) suşta duyarlı saptanmıştır. Kolistin için % 11.6 (5) suşta direnç, % 2.3 (1) suşta orta duyarlı ve % 86 (37) suşta duyarlılık saptanmıştır.



Şekil 11:Antibiyotik duyarlılıkları 1



şekil 12:Antibiyotik duyarlılıkları 2

Tablo 21: Diğer antibiyotiklere duyarlılık

		n	%
AMC	R	43	100,00
	I	0	0.0
	S	0	0.0
TZP	R	43	100,00
	I	0	0.0
	S	0	0.0
CAZ	R	41	95.3
	I	0	0.0
	S	2	4,70
CRO	R	40	93,00
	I	1	4,70
	S	2	4,70
FEB	R	35	81.4
	I	6	14,00
	S	2	4,70
AN	R	25	58.1
	I	8	18,60
	S	10	23,30
GM	R	31	72.1
	I	2	4,70
	S	10	23,30
CİP	R	41	95.3
	I	0	0.0
	S	2	4,70
COL	R	5	11,60
	I	1	2,30
	S	37	86,00
SXT	R	34	79.1
	I	0	0.0
	S	9	20,90

AMC: Amoksisilin-Klavulanik Asit, TZP: piperasilin-tazobaktam, CAZ: Seftazidim, CRO: Seftriakson FEB: Sefepim, AN: Amikasin, GM: Gentamisin, CİP: Siprofloksasin COL:Kolistin SXT: Ttrimetoprim-sulfamethoxazol

R: Dirençli, I: Orta Duyarlı, S: Duyarlı

5. TARTIŞMA

Yaşanı tehdit eden ciddi, çoklu ilaç direnci gösteren GN bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenektir. Bu nedenle karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası enzimler her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermekle birlikte her merkez için değişmeyen bir gerçek, oranların yıllar içinde artmakta olduğudur.

Hastane enfeksiyonuna yol açan mikroorganizmaların kaynağı ve bulaş yollarının belirlenmesi ve kontrol önlemlerinin alınmasında temel noktayı epidemiyolojik çalışmalar oluşturur [157]. Türlerin hızlı ayrımı, bir salgının olup olmadığına karar vermede önemlidir ve hastane enfeksiyonlarının kontrol araştırmaları için önemli bilgiler sağlar [158]. Antibiyotik duyarlılık testleri, yaygın kullanımları, standardize edilmiş olmaları ve çok sayıdaki etkene uygulanabilmeleri nedeniyle, birçok hastane salgınında temel tiplendirme aracı haline gelmiştir [159]. Ancak diğer fenotipik yöntemlerde olduğu gibi antibiyotik duyarlılık profilleri de, üreme ortamından, üreme fazından ve spontan mutasyon oranlarından etkilenebildiğinden kararlı bir tiplendirme yöntemi değildir. Bu sebeple tüm dünyada genotipik tiplendirme yöntemleri tercih edilmektedir [160]. Bakteriyel izolatlar arasındaki ilişkiyi incelemeye serotiplendirme, biyotiplendirme, antibiyotiplendirme ve bakteriyofaj tiplendirmesi yerini plazmid incelemesi, ribotiplendirme, PCR temelli tiplendirme yöntemlerine bırakmıştır [161].

Karbapenemazlardan D sınıfına ait OXA 48 türü beta-laktamaz ülkemizde ilk kez İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatmakta olan bir hastanın idrar kültüründen izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir [145, 154]. En çok Türkiye'de ve çok yakın zamanda da Lübnan ve Belçika'daki *K. pneumoniae* suşlarında tanımlanmıştır [162-164]. OXA 48 karbapenemaz Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde de giderek yaygın hale gelmektedir [165].

Ülkemizde çok merkezli karbapenem direncinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar olmakla beraber direnç mekanizmalarına yönelik moleküler çalışmalar sınırlıdır [13, 14, 166, 167]. Yapılan bazı bölgesel çalışmalarda ise karbapenem direnci ile ilişkili OXA 48 karbapenemaz aktivitesi enterik GN bakterilerde gösterilmiştir [76, 168].

Perez ve arkadaşları [169] yaptıkları bir çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem direncinin başka bir hastaneden transfer olma ya da uzun süreli bakım merkezlerinden kabul edilme ile önemli bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. İsrail’de yapılan bu çalışmada postakut bakım merkezleri karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* için büyük bir rezervuar olarak gösterilmiştir. Saidel-Odes ve arkadaşları [170] yaptığı çalışmada yoğun bakım ünitesinde kalış, santral venöz kateter varlığı, antibiyotik kullanımı ve diyabetin varlığını *Enterobacteriaceae*’ da karbapenem direnci için bağımsız prediktör olarak belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde 43 hastanın 27 tanesinde yoğun bakımda yatış mevcuttu. Bunların %32.6 sı cerrahi yoğun bakımda, %30.2 si dahili yoğun bakımda takip edilmekteydi (Tablo 6). Hastanemizin kalp damar cerrahisi, kök hücre ve solid organ nakli konusunda referans hastane olmasından dolayı takip edilen hastaların büyük çoğunluğunda daha öncesinde başka merkezlerde takip ve yatış öyküleri bulunmaktaydı.

Kalpo ve arkadaşları [171] yaptığı çalışmada takip edilen hastaların %23’ünde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu tespit etmişlerdir. On dört hastanın 7 tanesi 30 gün içinde olmak üzere hastaların %71’i takip sırasında exitus olmuş. Viale ve arkadaşları [172] yaptıkları çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ile meydana gelen kan akımı enfeksiyonlarında mortalite oranını yaklaşık %50 oranında belirtmişlerdir. Altta yatan ciddi hastalık, yoğun bakım servisinde yatış, uygun tedavinin başlangıcında gecikme olması bu hastalardaki mortalite için en sık risk faktörleri olarak gösterilmiştir.

Hussein ve arkadaşlarının [173] karbapenem duyarlı ve dirençli *K. pneumoniae* ile meydana gelen kan dolaşımı enfeksiyonlarını karşılaştırdıkları çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae* olan hastalardaki mortalite oranı karbapenem duyarlı olanlara göre daha yüksek saptanmıştır. Bu çalışmada karbapenem direnci mortalite için bir risk faktörü olarak saptanmamış. *K. pneumoniae*’li kan dolaşımını enfeksiyonu olan hastalarda, mortalite karbapenem direnci ile ilişkili bulunmamıştır. Fakat ciddi komorbiditiler ile (kronik karaciğer hastalıkları, mekanik ventilasyon, hemodiyaliz gibi) ilişkili olarak değerlendirilmiştir.

Yaptığımız çalışmada çeşitli kültürlerinde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izole edilen 43 hastanın takibinde %58.1 (25)’i exitus olmuştur. Daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde kan akımı enfeksiyonu olması yüksek mortalite ile ilişkili bulunmuştur. Ölen hastaların % 32’sinin kan kültüründe, % 24’ünün solunum izolatlarında, % 20’sinin rektal sürüntüsünde, % 12’sinin idrar kültüründe, % 8’inin yara kültüründe, % 4’ünün batın içi mayi kültüründe üreme olmuştur (Tablo 6). Bizim çalışmamızda da daha

önce yapılan çalışmalara benzer şekilde yoğun bakımda yatış ile mortalite arasında ilişki bulunmuştur. Exitus olan hastaların yattıkları klinikler değerlendirildiğinde % 40' ının dahili yoğun bakımda ve sırasıyla %36'sının cerrahi yoğun bakımda, % 12'sinin KİT servisinde ve % 12'sinin dahiliyede takip edildiği görülmüştür (Tablo 6).

Patel ve arkadaşları [174] daha önce yaptıkları vaka kontrol çalışmasında hastanede yatan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu olan hastaların duyarlı olan hastalara göre mortalite oranının daha yüksek olduğunu göstermişlerdir (sırası ile %48,%20, p<0.001). Bu çalışmada transplant alıcısı olmak, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu için bağımsız bir risk faktörü olarak gösterilmiştir. Perez ve arkadaşları [169] mortaliteyi non bakteriyemik hastalarda %30, karaciğer nakli yapılmış ya da kan akımı enfeksiyonu olanlarda % 72'ye kadar çıkan oranda bildirilmiştir. Bu hastaların ortak özellikleri yaşlı, debil ve diyabet gibi immunsupresyonu içeren çok sayıda komorbiditeleri olan kişiler olmalarıdır. Karbapenem dirençli *K pneumoniae* ile enfekte olan hastalar, karbapenem duyarlı suşlarla enfekte olanlar ile karşılaştırılmıştır. Bunun sonucunda organ veya kök hücre nakli ya da mekanik ventilasyon ve enfeksiyon öncesinde uzun süreli hastanede yatış olması direnç ihtimalini arttırmıştır. Başka bir retrospektif kohort çalışmasında, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonu olan transplant hastalarını da içeren heterojen hasta popülasyonunda mortalite % 60 olarak bulunmuştur [175]. Bizim çalışmamızda da 43 hastanın 19'unda kök hücre- solid organ nakli öyküsü mevcuttu. Nakil uygulanan 19 hastanın 10 tanesinde karaciğer nakli, 6' sında KİT, 2'sinde böbrek nakli, 1' inde kalp nakli öyküsü vardı. Bu hastaların 7 tanesi takip sırasında exitus olmuştur (Tablo 7).

“Karbapenemlerin Gram-Negatif Patojenlere Karşı İn Vitro Aktivitelerinin Karşılaştırmalı Değerlendirmesi: COMPACT Çalışması” Türkiye Verisinde Türkiye genelinde toplam 10 merkezden Eylül-Aralık 2008 tarihleri arasında, yoğun bakım ünitesi (YBÜ) ve YBÜ dışı hastalardan, toplam 596 adet klinik izolat toplanmıştır. İzolatların % 40.3'ü *Enterobacteriaceae* ve % 9.9'u diğer gram-negatif etkenlerden oluşmaktadır. Her merkezde Etest® (AB Biodisk, Solna, İsveç) kullanılarak tüm izolatlar için doripenem, imipenem ve meropenemin minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) belirlenmiştir. İzolatlardan 188 (% 31.5)'i en az bir karbapeneme dirençli bulunmuştur. *Enterobacteriaceae*'ya karşı meropenem ve imipenemle eşit ya da daha aktif bulunmuştur. Elde edilen bulgulara göre doripenem, *Enterobacteriaceae*'ya karşı meropenem ile benzer aktivite gösterirken, imipenemden daha aktif bulunmuştur [176].

Karbapeneme dirençli suşların tespitinde; broth mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon, E-test ve otomatize yöntemlerden çok daha yüksek duyarlılık göstermektedir. İmipenem, meropenem, ertapenem için antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, E-test ve otomatize sistemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada en duyarlı sonuçların %94-97 oranında dilüsyon yöntemleriyle elde edildiği bildirilmiştir. E test %58-90, otomatize sistemler ise %48-98 oranında duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak, otomatize sistemlerin duyarlılığı yine çalışılan yönteme göre değişiklik göstermiştir [12, 177]. Bizim çalışmamızda duyarlılık belirlemek için disk difüzyon, E test ve otomatize yöntem olan Vitek-2 Compact sistemini kullanılmıştır. Disk difüzyon yöntemi ile 43 suşun tamamında ertapenem direnci saptanırken meropenemde % 95.3 imipenemde % 83.7 oranında direnç saptanmıştır (Tablo 9). E test yöntemi ile ertapenem için % 97.7 oranında direnç ya da azalmış duyarlılık saptanırken otomatize sistemde % 100 oranında direnç saptanmıştır (Tablo 9). E test yöntemi ile % 93 oranında görülen meropenem direnci ya da azalmış duyarlılığı otomatize sistemde % 90.7 idi. Meropenem E test MIC ile Meropenem Vitek MIC arasında uyum saptanmadı ($p > 0,05$) (Tablo 9). İmipenemde direnç ya da azalmış duyarlılık E test ile otomatize sistem için sırası ile % 79.1 , % 88.4 olarak saptandı. İmipenem E test MIC ile İmipenem Vitek MIC arasında uyum bulunmadığı saptanmıştır ($p < 0,05$) (Tablo 9). İki yöntem ile belirlenen MIC değerlerinde meropenem, imipenem ve ertapenem için E test yönteminde Vitek'e göre daha yüksek MIC değerleri saptanmıştır. Çalışmamızda karbapenemler içerisinde imipenemi izole ettiğimiz mikroorganizmalara karşı daha etkili olarak bulduk. Bunun nedeninin hastanemizde imipenemin diğer karbapenemlere göre daha az tercih edilmesi olarak yorumladık.

Karbapenemaz aktivitesini gösteren uygulanması kolay fenotipik yöntemlerden birisi de Modifiye Hodge testi (MHT)'dir. Bu test CLSI tarafından en az bir geniş spektrumlu sefalosporin alt grubundaki antibiyotiklerden birine direnç (örn. sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson) veya karbapenem MIC değerlerinde yükselme ve inhibisyon zon çaplarında azalma olması durumunda önerilmekteydi. Son güncelleme ile karbapenem inhibisyon zon çapları ve MIC değerlerinin belirlenmesi yeterli kabul edilmektedir [178]. Ancak rutin olarak dilüsyon yöntemlerinin çalışılmadığı laboratuvarlarda KPC, OXA ve MBL gibi enzimlerin hepsini birden tespit edebilmesi ve uygulanması kolay bir test olması nedeniyle kullanışlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır [12, 177, 179]. Modifiye Hodge testi CLSI kılavuzuna göre %95-100 oranında duyarlıdır. Fakat kişiselleşebilecek bir yöntem olması testi yorumlarken güçlükler neden olabilir. Ayrıca KPC, MBL ve OXA

enzimlerinin ayırımını ortaya koyamaması nedeniyle epidemiyolojik olarak kullanışlı bir test değildir ve özgüllüğü düşüktür.

Modifiye Hodge testinin duyarlılığı ayrıca hangi karbapenem molekülü ile test edildiğine göre değişmektedir. Karbapenemaz aktivitesinin belirlenmesinde değişik karbapenem moleküllerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada meropenemin daha özgün, ancak ertapenemin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ertapenemin herhangi bir test tarafından dirençli ya da azalmış duyarlılıkta bulunması, imipenem ve meropeneme göre daha önemli bir göstergedir [12]. Öte yandan ertapenem, imipenem ve meropenemden daha düşük özgüllüğe sahiptir. Çünkü AmpC ve GSBL gibi diğer beta-laktamazların üretimi ve azalmış permeabilite imipenem ve meropenemden daha çok ertapenem MIC değerlerini değiştirir [10, 177, 180]. *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında in vitro karbapenemaz aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, GSBL pozitif suşlarda imipenem, meropenem ve doripenem için MIC₉₀ değerlerinde iki kat titre artışı tespit edilmiştir. Ertapenem için ise MIC₉₀ değerinde üç kat dilüsyon artışı izlenmiştir [10]. Karbapenemaz üretiminin çoğunlukla düşük düzeyde olması nedeniyle suşların % 60 kadarında meropenem ve imipenem için MIC değerleri duyarlı sınırlar arasında yer almaktadır. Bu nedenle karbapenemaz aktivitesinin fenotipik olarak belirlenmesinde tarama amacıyla ertapenem kullanılması önerilmektedir [180]. Bizim çalışmamızda da izole edilen tüm suşlarda ertapenem direnci saptanırken meropeneme %95.3, imipeneme ise % 83.7 oranında direnç saptanmıştır (Tablo 9).

Son yıllarda yapılan bir çalışmada ise indikatör suş olarak *E.coli* ATCC 25922 yerine *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılarak MHT sonuçlarının duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmıştır. *K. pneumoniae*'nin indikatör suş olarak kullanıldığı çalışmada duyarlılık ve özgüllük daha yüksek saptanmıştır (sırası ile %100, %97) [181].

Raghunathan ve arkadaşları [182] 2011'de; 55 *K. pneumoniae*, 17 *E. cloacae*, 2 *E.coli* ve 2 *S. marcescens* ile yaptıkları çalışmada suşların PCR sonuçları ile MHT'yi karşılaştırmışlardır. *Klebsiella*'ların 48'ni, *E. cloacae*'nin 4'nü, *S. marcescens*'in 1'ini Vitek-2 sistemi ile karbapenemlere dirençli saptamışlardır. PCR ile KPC geni bakılan izolatlarda, PCR pozitifliği ile MHT pozitifliği karşılaştırıldığında iki testin arasında %96 oranında bir korelasyon tespit edilmiştir. PCR negatifliği ile MHT negatifliği karşılaştırıldığında ise %90 oranında bir korelasyon olduğunu rapor etmişlerdir. Bu sonuçlar istatistiksel olarak iki test arasında kuvvetli uyum olduğu şeklinde yorumlanmıştır. Ramana ve arkadaşları [183] yaptığı bir çalışmada Hindistan'da 1072 *Enterobacteriaceae* suşunda karbapenem direncini araştırmışlardır. Yöntem olarak meropenem ile MHT uygulamışlardır. Sonuç olarak suşların % 35.9 (385\1072)'unda karbapenemaz saptamışlardır. Bu suşların dağılımı; % 28.7 (80\278)

Klebsiella spp., % 20.4 (25/122) *Citrobacter spp.*, % 11.3 (38/334) *E. coli*, % 20.3 (45/221) *Enterobacter spp.*, ve % 16.2 (9/117) *Proteus spp.* şeklinde bulunmuştur. Karbapenem direnci en yüksek oranda *Klebsiella spp.*' de saptanmıştır. *Proteus spp.* ve *Citrobacter spp.* de nispeten daha düşük oranlar görülmüştür. Bu çalışma ile karbapenemaz aktivitesini saptamada MHT kolay uygulanabilir, maliyet etkin ve minimal alt yapıya ihtiyaç duyan bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda da karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının dağılımı *Klebsiella spp.* ağırlıklıdır. İzole edilen suşların % 88.4'ü *K. pneumoniae*, % 9.3'ü *E. coli* ve %2.3 'ü *K. oxytoca*'dır (Tablo 8).

Pournaras ve arkadaşları [184] efektif enfeksiyon kontrolü amacı ile rektal karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* taşıyıcılığını araştırmak için meropenem kombine disk testinin performansını değerlendirmişler. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* taşıyıcılığı açısından yüksek riskli olan 189 hastadan rektal sürüntü alınmıştır. MacConkey agara tek başına meropenem diski, meropenem + phenyl boronic acid (PBA), meropenem+ EDTA ve meropenem+ PBA+EDTA yerleştirilmiştir. Sonuçları karşılaştırmak için PCR ve ertapenemli MacConkey kullanılmıştır. Sürüntü kültürü alınan 189 hastanın 97'sinde bu üç yöntemden biri ile doğrulanmış karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* saptanmıştır. Sonrasında fenotipik ve moleküler yöntemlerle doğrulanarak 60 KPC, 9 VİM, 25 KPC ve VİM ve 3 OXA 48 pozitif saptanmıştır. Özellikle meropenem kombine test ile 97 örneğin 57 tanesinde KPC, 9 tanesinde MBL, 25 tanesinde MBL ve KPC ve 1 tanesinde OXA 48 olmak üzere toplam 92 tanesinde karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* saptanmıştır (sensitivite % 94.8, spesifisite, % 100). Perçin ve arkadaşları [166] yaptıkları çalışmada rektal sürüntü örneklerinden izole edilen 33 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının 13 (% 39.4)'ünde PCR ile herhangi bir direnç geni saptamazken, 20 pozitif suşun 19 (% 95)'unda OXA 48, 1 (% 5)'inde ise IMP saptamıştır. PCR ile direnç geni gösterilen 20 suşun tamamı imipenem ve ertapenem dirençli bulunmuş; suşların 2 (%10)'sinin doripenem ve meropeneme duyarlı olduğu belirlenmiştir. Direnç geni gösterilemeyen tüm suşlarda MHT negatif iken, OXA 48 saptanan bir suşta da MHT negatif bulunmuştur. Bu suş aynı zamanda doripenem ve meropeneme de duyarlıdır. Alışkan ve arkadaşlarının [185] yaptıkları çalışmada 952 karbapenemaz üretimi şüpheli olan *Enterobacteriaceae* izolatına MHT yapılmış, 13'ünde test sonucu pozitif bulunmuştur (% 1.4). Modifiye Hodge testi pozitif bulunan izolatların 8'i *K.pneumoniae*, 2'si *E.coli*, 2'si *E. aerogenes*, 1'i *K. oxytoca* olarak tanımlanmıştır.

Biz de yaptığımız çalışmada 43 suşun 35'inde MHT pozitifliği saptadık. Pozitif olan 35 suşun PCR ile 4 tanesinde OXA 48 pozitifliği saptandı. MHT negatif saptanan suşlardan 1 tanesi NDM 1 pozitif idi. MHT testi negatif olan 7 suşun 3 tanesi PCR ile OXA 48 pozitif saptandı. Modifiye Hodge Testi pozitifliği ile OXA 48 pozitifliği arasında uyum mevcuttu ($p < 0,05$) (Tablo 13).

Karbapenemazlara özgün inhibitörlerin ilavesiyle, karbapenemaz aktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi, tanıda yardımcı bir diğer yöntemdir. Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit (3 aminofenil boronik asit), sınıf B metallobeta-laktamazlar için EDTA ya da dipikolinik asidin karbapenemaz aktivite inhibitörü olarak kullanılması birçok çalışmada önerilmiştir [12, 186]. Boronik asit fenotipik testinin KPC pozitif suşların belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber ticari, hazır elde edilebilir olmaması ve sonuçların açıklanması için bir güne daha ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır [180].

Yaptığımız çalışmada sınıf B metallobeta-laktamazların saptanması için İPM\İPM+EDTA (MBL) E testini kullanılmıştır. Kırk üç izolatanın 2 tanesinde pozitiflik saptandı. PCR yöntemi ile yapılan çalışmada İPM\İPM+EDTA pozitif olan 2 izolattan 1 tanesi NDM 1 pozitif bulunmuştur. İPM\İPM+EDTA ile NDM 1 arasında uyum saptanmıştır ($p < 0,05$) (Tablo 14).

Dizbay ve arkadaşlarının [187] *Klebsiella spp* enfeksiyonlarında karbapenem direncini araştırdıkları bir çalışmada 840 atakta 42 tane suş izole edilmiştir. Karbapenem dirençli olan izolatların diğer antibiyotiklere karşı da önemli oranda dirençli olduğu gösterilmiştir. AMC'ye % 100 oranında direnç saptanırken TZP'ye % 80.9, CAZ'a % 78.5, CİP'e % 73.8, SXT'ye % 88.1, FEB'e % 85.7 oranında direnç görülmüştür. Bu çalışmada kolistine dirençli suş saptanmamıştır. Us ve arkadaşlarının [161] 3 yıl sürecinde izole edilen 26 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarını inceledikleri çalışmada tüm suşlar TZP'ye karşı dirençli saptanmıştır. Suşların 25'inde AMC, 18'inde CAZ, 25'inde SXT, 18'inde GEN, 21'inde CİP direnci, 2 suшта CİP'e azalmış duyarlılık saptanmıştır, kolistin ve tigesikline ise direnç saptanmamıştır. Won ve arkadaşlarının [188] 1 yıllık periyotta yaptığı çalışmada 38 *K. Pneumoniae*, 2 *E. Coli* olmak üzere toplam 40 karbapenem dirençli izolat saptanmıştır. Tüm suşlar diğer beta-laktam antibiyotikler ve siprofloksasine dirençli bulunmuştur. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının % 98'inde trimethoprim-sulfamethoxazole direnci saptanmıştır. Tigesiklin, suşların % 48.5'ine aktif bulunmuştur. Bu çalışmada kolistin ve gentamisin en etkili antibiyotikler olarak belirtilmiştir. Patel ve arkadaşlarının [174] 2004

ile 2006 tarihleri arasında değerlendirdikleri 375 invaziv *K. pneumoniae* enfeksiyonunun 99'unda karbapenem direnci saptanmıştır. Doksan dokuz izolatin 58'i gentamisine, 51'i amikasine, 51'i tetrasikline duyarlı olarak bildirilmiştir. Çalışma sürecinde 99 izolatin 80 tanesine tigesiklin ve kolistin duyarlılığı bakılmıştır ve bu 80 izolatin 72'si kolistine, 74' tigesikline duyarlı olarak bulunmuştur. Teo ve arkadaşları [189] Singapur'da ertapenem duyarlı ve dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarındaki risk faktörleri, moleküler epidemiyoloji ,ve sonuçlarını inceledikleri retrospektif bir vaka kontrol çalışmasında ertapenem dirençli, toplam 29 izolatin %100' seftriaksona ve amoksisilin klavulanata, %97 'si piperasilin tazobaktama, %79' u siprofloksasine ve %76'sı sefepime dirençli saptanmıştır. Ertapenem dirençli izolatlar amikasin (%3 direnç) ve gentamisin (%41 direnç) rölatif olarak daha duyarlı olarak belirtilmiştir.

Bizim yaptığımız çalışmada ise amikasin ve gentamisin diğer antibiyotiklere göre nispeten daha duyarlı idi (% 23.3) (Tablo 21) . İzole edilen suşların % 100' amoksisilin klavulanata ve piperasilin tazobaktama dirençli idi. Seftazidim direnci % 95.3, seftriakson % 93, sefepim %81.4 oranında idi. Aminoglikozidlerden amikasin suşların % 25'inde dirençli, % 18.6'inde orta duyarlı iken gentamisin % 72.1'inde dirençli, % 4.7'sinde orta duyarlı saptanmıştır. Siprofloksasin % 95.3'ünde, trimethoprim-sulfamethoxazole % 79.1'inde dirençli saptanmıştır. Kolistin karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarının % 79.1'inde duyarlı % 2.3'inde orta duyarlı bulunmuştur. 43 izolatta kolitsin en duyarlı antibiyotik olarak saptanmıştır (Tablo 21).

Hastanemiz referans bir merkez olduğundan; takip edilen hastaların büyük çoğunluğunda başka hastaneden transfer olma, eşlik eden multiple komorbiditeler, uzun süreli hastane yatışı ve yoğun bakım izlemi, öncesinde geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı gibi dirençli mikroorganizmalar için bilinen risk faktörleri bulunmaktadır. Bu durum hastalardan daha dirençli suşlar izole edilmesine neden olabilmektedir.

Karbapenemazlardan D sınıfına ait OXA 48 türü beta-laktamaz ülkemizde ilk kez İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde yatmakta olan bir hastanın idrar kültüründen izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir. En ok Türkiye'de ve çok yakın zamanda da Lübnan ve Belçika'daki *K. pneumoniae* suşlarında tanımlanmıştır [162-164]. OXA 48 karbapenemaz Akdeniz ve Avrupa lkelerinde de giderek yaygın hale gelmektedir [165].

Ülkemiz için ise enterik GN bakterilerde henüz KPC karbapenemaz direnci bildirilmemiştir. NDM direnci son yıllarda olgu sunumları olarak bildirilmeye başlanmıştır. Ancak, özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olan enterik GN bakteriler ailesi yeleri arasında

sınıf D OXA karbapenemaz aracılı karbapenem direnci yaygınlaşmaktadır. Çok merkezli karbapenem direncinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar olmakla beraber direnç mekanizmalarına yönelik moleküler çalışmalar sınırlıdır [13, 14]. Yapılan bazı bölgesel çalışmalarda enterik GN bakterilerde karbapenem direnci ile ilişkili OXA 48 karbapenemaz aktivitesi gösterilmiştir [76, 168].

Nazik ve arkadaşları [190] İstanbul'un farklı bölgelerinde hastaneye yatmış olan hastalardan izole edilen, OXA 48 pozitif *E. coli* ve *C. koseri* izolatlarını incelemişlerdir. Her iki izolatta saptanan OXA 48 geni alıcı bakteriye aktarılmıştır. Transkonjuganlarda karbapenemler için saptanan MİK değerleri alıcı bakteriye göre iki kat daha yüksek bulunmuştur. Bu deneyle araştırmacılar, OXA 48 geni bulunan izolatların, bu direnç genini taşıdığı halde karbapenemlere duyarlı bulunabileceğini ve bu izolatların laboratuvarlarda tespitinin güçlükler çıkarabileceği sonucuna varmışlardır. Bu çalışma ile ayrıca OXA-48 geninin *K. pneumoniae* suşlarında yaygın olmakla birlikte, *C. koseri* gibi diğer suşlar arasında da yayılabileceğini belirtmişlerdir [190]. Perçin ve arkadaşları [166] Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının direnç genlerini multipleks PCR ile araştırmışlar ve 33 suşun 13'ünde (%39.4) hiçbir direnç geni saptamışlardır. Direnç geni pozitif bulunan 20 izolattan 19'unda (%57.8) OXA-48, 1'inde (%2.8) IMP direnç geni saptamışlardır.

Baroud ve arkadaşları [191] Lübnan'da yaptıkları bir çalışmada 11 GSBL üreten karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda disk diffüzyon ve E test ile karbapenem dirençlerini belirlemişler ve çeşitli moleküler testlerle bu suşların NDM 1, OXA 1, OXA 48, IS1999 genlerini araştırmışlardır. 11 suşun tamamında OXA 1 geni saptanırken 2'sinde OXA 48, 2'sinde NDM 1 saptanmış, OXA 48 bulunanlarda IS1999'da belirlenmiştir. OXA 48 pozitif olanlarda karbapenem direnci her iki yöntemde de diğer karbapenemlerden daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışma sonunda araştırmacılar *Klebsiella*'larda karbapenem direnci AmpC tip ya da GSBL enziminin ekspresyonu ile porin kaybına bağlı olarak görünse de MIC farklılıklarının gözardı edilmemesi gerektiğini belirtmişlerdir. Yükselmiş MIC'lerin test edilemeyen direnç genleri ile beraber selektif baskı, uzamış tedavi, membran geçirgenliğinin bozulması ve mevcut direnç gen düzeylerinin farklılığından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Voulgari ve arkadaşları [165] tarafından 2012 yılında Yunanistan'da yapılan bir çalışmada 17 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının hepsinde OXA 48, CTX M 15 ve OXA 1 genlerini tespit edilmiştir. OXA 48'in Tn1999'da lokalize IS1999 ile ilişkili olduğu bulunmuş, bu genin yaklaşık 62 kb olan bir plazmidde bulunduğu ve bu lokalizasyonda

başka direnç genlerinin bulunmadığı belirlenmiştir. Pano-pardo ve arkadaşları [192] İspanya'da 2011 yılında meydana gelen salgın hakkında yaptıkları çalışmada 71 hastadan toplam 173 tane karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izole edilmiştir. Karbapenamaz yapımı MHT ile doğrulanmıştır. Sonrasında moleküler yöntem ile *KPC*, *VİM*, *İMP*, *NDM 1* ve *OXA 48* karbapenamaz genleri ve *TEM*, *SVH*, *CTX M* ve *OXA 1* β-laktamaz genleri çalışılmıştır. İzolatların hepsinde *OXA 48* direnç geni pozitif saptanmıştır. *OXA 48*'in Tn1999'da lokalize IS1999 ile ilişkili bulunmuştur [192].

İspanya'da 2011 ile 2102 tarihleri arasında 6 farklı bölgeden 10 merkezin katıldığı çok merkezli bir çalışma ile *OXA 48* direnç geni pozitif *K. pneumoniae* suşlarının moleküler özelliklerinin araştırılması planlanmıştır. Toplanan 151 tane *K. pneumoniae* suşuna moleküler yöntemle *OXA 48 benzeri*, *KPC*, *VİM*, *İPM* ve *NDM*, ESBL varlığı için (*TEM*, *SVH* ve *CTX M*) ve plasmid-aracılı AmpC varlığı için (*CMY*, *FOX*, *MOX*, *DHA*, *EBC* ve *ACC*) genleri araştırılmıştır. Yirmi bir tane *OXA 48 benzeri* dirence sahip *K. pneumoniae* izolatının 19 tanesinde *OXA 48*, 1 tanesinde *OXA 244* ve 1 tanesinde de *OXA 245* pozitif saptanmıştır. Daha önce yapılan araştırmalarla *OXA 48* in sadece 5 varyantı *OXA 162*, *OXA 181*, *OXA 204*, *OXA 232* (hepsi 1 ile 5 amino asid yer değiştirmiş ve substrat profili *OXA 48*'inkine çok benzer) ve *OXA 163* (4 amino asitlik bir delesyon ve 1 amino asitlik yer değişimi; Ser-220→Asp) tanımlanmıştır. *OXA 163*'ün, *OXA 48* in aksine geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize ederken karbapenemler üzerinde çok az etkisi vardır. Yeni tanımlanan *OXA 244*'in Arg-222→Gly ve *OXA 245*'in Glu-125→Tyr şeklinde olmak üzere tek amino asitlik yer değişimi gösterilmiştir [193-195].

Adler ve arkadaşlarının [196] 2011 yılında yayınladıkları bir çalışmada İsrail'de ilk *OXA 48* geni izole edilen hastalar ve özellikleri üzerinde durulmuştur. İsrail'de 2006 yılından beri *Enterobacteriaceae*'da izole edilen karbapenem direncinin ana sorumlusu *KPC* pozitif *K. pneumoniae* iken 2007 yılından sonra sağlık turizmi nedeni ile diğer direnç genleride izole edilmeye başlanmıştır. *OXA 48* direnç geni izole edilen ilk hasta Ürdün'den onkolojik tedavi nedeni ile refere edilmiştir. İkinci hasta Qalqyia-Filistin'li olup 2010'da Amman-Ürdün'de kolanjiokarsinom nedeni ile opere olup 2010'da Kudüs' e transfer edilmiştir. Üçüncü ve dördüncü hastanın rektal kültüründe saptanmıştır. Dördüncü hastanın kısa süreli hastane yatışı mevcut olup Ürdün'e sık ziyaret öyküsü tespit edilmiştir. Suşların hepsinde MHT pozitif, boronik asit ile inhibisyon, EDTA ve dipikolinik asit tesleri negatif saptanmıştır. PCR yöntemi ile *OXA 48* direnç geni pozitif saptanmıştır. Bu çalışma ile sağlık turizmi nedeni ile direnç genlerinin farklı coğrafi bölgelere gidebildiği gösterilmiştir.

Dimou ve arkadaşları [197] Birleşik Krallık'ta 22 ayrı merkezden toplanan 26 tane OXA 48 benzeri karbapenemaz pozitif olan *Enterobacteriaceae* suşunu incelemiştir. Bu çalışmada PCR ve sekanslama yöntemleri ile 25 suşta OXA 48, 1 suşta OXA 181 direnç genleri saptanmıştır. OXA 181 pozitif olan hastanın Hindistan'a seyahat öyküsü tespit edilmiştir. OXA 48 pozitif olan izolatların tür dağılımı 13 *K. pneumoniae*, 10 *E. coli* ve 2 *E. cloacae* şeklinde bulunmuştur. Bu suşlardaki OXA 48 genleri Tn 1999 bölgesine yerleşmişlerdir. İlgili plasmidlerin horizontal transfer ile OXA 48 karbapenem genlerini farklı *Enterobacteriaceae* türleri arasında yayılımını kolaylaştırdığı gösterilmiştir.

Ülkemizde özellikle son yıllarda sağlık turizmi giderek artmaktadır. Refere edilen hasta yelpazesinin giderek artması ve hasta kabulünün yapıldığı coğrafi bölgelerin artışı bununla beraber dirençli mikroorganizmalarla temas ihtimalinde arttırmaktadır. Çalışmamızda izlenen 3 yurtdışı kökenli hastadan ilki Makedonya'dan otoimmün karaciğer sirozu nedeni ile karaciğer nakli amaçlı gelmiştir. İkinci hasta Libya'dan ateşli silah yaralanması nedeni ile vertebra cerrahisi amacı ile gelmiştir. Nörojenik mesane nedeni ile operasyon sonrası da uzun süreli idrar sondası kullanılmıştır. Üçüncü hasta Azerbaycan'dan kardiyak cerrahi amaçlı hastanemize refere edilmiştir. Koroner arter By pass operasyonu sonrasında gelişen akciğer sorunları nedeni ile cerrahi yoğun bakımda uzun süre takip edilmiş. Üç hastada şifa ile taburcu edilmiştir. Merkezimiz organ nakli, ortopedik vertebra cerrahisi ve kalp damar cerrahisi alanlarında deneyimli bir merkezdir. Bu bölümlerde takip edilen hastalar genellikle başka hastanelerden yönlendirilmiş olup yoğun bakımda yatış öyküsü, mevcut hastalıkları nedeni ile uzun süreli hastane yatışı öyküsü ve yurt dışından gelen hastalar olmaları nedeni ile merkezimizde bu tür dirençli mikroorganizmalar daha sık görülmektedir.

Asya'da KPC pozitif *Enterobacteriaceae* ilk defa 2004 yılında Çin'de bir *K. pneumoniae* 'da tespit edilmiştir. Daha sonra *C. freundii*, *E. coli*, and *S. marcescens* 'da bulunmuştur [77]. Tayvan'da ilk KPC 2 direnç geni pozitif hastalar Çin'de hastanede yatışı olan üç hastadan izole edilmiş [198-200]. O tarihten sonra KPC 2 pozitif *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının Tayvan'da saptanması artmıştır [201]. Tayvan'da *E.coli*'de ilk NDM 1 direnç geni Ma ve arkadaşlarının karbapenem dirençli *E.coli* suşlarını inceledikleri çalışmada saptanmıştır. Çalışma sırasında aynı hastanede NDM 1 pozitif *K. pneumoniae* suşunda izole edilmiş olup farklı paterndeki plasmidlerde bulunmuştur. Bu çalışmada 2010 yılında izole edilen tüm suşlar tigesiklin ve kolistine duyarlı iken 2012'de tigesikline %7, kolistine %2.3 direnç saptanmıştır [202].

Türkiye’ de ilk NDM 1 direnç geni 2011 yılında Poirel ve arkadaşları tarafından 16 yaşında lösemili Irak’ tan gelen ve allogeneik kök hücre nakili yapılan hastada izole edilmiştir. Nakil sonrası 2. haftada ciddi solunum yetmezliği ve ateş gelişen hasta yoğun bakım ünitesine transfer edilmiş ve kan kültüründe *K. pneumoniae* ve *E. coli* olmak üzere 2 çeşit multi drug dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu saptanmıştır. Hasta meropenem, teikoplanin ve colistinini içiren antibiyoterapiye rağmen septik şok nedeni ile ölmüştür. İzole edilen, *K. pneumoniae* imipenem, meropenem ve ertapeneminde dahil olduğu tüm B laktamlara, aminoglikozid, florokinolon, nitrofurantoin, kloromfenikol ve trimethoprim-sulfamethoxazole dirençli olup sadece tigesiklin ve kolistine duyarlı bulunmuştur. *E. coli* karbapenemlerinde dahil olduğu tüm beta laktamlara, florokinolon, tetrasiklin, gentamisin, tobramisin ve sulfanamidlere dirençli olup sadece tigesiklin ve kolistine hassas bulunmuştur. İmipenem ve EDTA ile kombine E test kullanılarak yapılan Metallo- β -lactamase (MBL) testi *K. pneumoniae* için pozitif saptanmıştır. PCR, sekanlama ve plasmid analizi ile *K. pneumoniae* SAL1 ‘nin NDM 1 ve CTX M, *E. coli* SAL2 ‘nin OXA 48 ve CTX M içerdiği saptanmıştır. Bu olgu ile Türkiye’de yurt dışı temaslı ilk NDM 1 direnç geni saptanmıştır [203].

Yanık ve arkadaşlarının [167] Samsun’da yaptıkları çalışmada 210 imipenem, meropenem veya doripenem antibiyotiklerinden en az birine dirençli gram-negatif suşlarda MHT ile karbapenemaz varlığı araştırılmıştır. PCR ile NDM-1 varlığının ile araştırılmasını hedeflemiştir. Çalışmanın sonucunda, toplam 210 klinik izolatu hiçbirinde NDM-1direnç gen pozitifliği tespit edilmemiştir. Bu sonuçlar NDM-1 varlığının ülkemizde henüz yaygın olmadığına işaret etmektedir. Türkiye’de yurt dışı temas öyküsü olmayan ilk NDM 1 direnç geni Alp ve arkadaşları tarafından 2012 yılında tespit edilmiştir. Bu çalışmada 137 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşu incelenmiştir. Bunların 94’ünde direnç geni çalışılmış olup çalışılan izolatların % 91.5’inde OXA 48, % 3.2’sinde İMP ve % 4.3’ ünde tek başına NDM 1, % 1’ inde OXA 48 ve NDM 1 birlikte saptanmıştır. Bu çalışma Türkiye’yi NDM 1 izole edilen ülkeler listesine eklemiştir. NDM 1 tespit edilen hastanın Hindistan ile temas öyküsü bulunmamıştır [204].

Poirel ve arkadaşları tarafından [205] İstanbul’da yapılan çalışmada 22 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatu değerlendirilmiştir. Bu çalışmada *K. pneumoniae*’da OXA 48, NDM 1 ve KPC 2, *E. cloacae*’de NDM-1, ve *E.coli*’de OXA 48 direnç genleri saptanmıştır. OXA 48 direnç geni saptanan tüm *K. pneumoniae* ve NDM 1 direnç geni saptanan tüm *E. cloacae* suşlarında klonal ilişki saptanmıştır. Bu çalışma ile yenidoğan yoğun

bakım ünitesinde tek bir klondan yayılan NDM 1 direnç geni pozitif *E. cloacae* ile meydana gelen salgın üzerinde durulmuştur.

Bizim yaptığımız çalışmada MBL E testi 1 *K. pneumoniae* ve 1 *E. coli* olmak üzere 2 izolatta pozitif saptanmıştır. Bu iki izolattan *K. pneumoniae*'da NDM 1 direnç geni pozitif bulunmuştur. NDM 1 direnç geni pozitif *K. pneumoniae* izole edilen hasta dekompanse karaciğer sirozu nedeni ile canlıdan karaciğer nakli yapılan bir hastada saptanmıştır. Operasyon sonrasına cerrahi yoğun bakım ünitesinde takibi sırasında alınan rektal sürüntü kültüründe NDM 1 direnç geni pozitif *K. pneumoniae* izole edilmiştir. Hastanın yurt dışı öyküsü bulunmamakta idi. Hasta organ nakli sonrası gelişen komplikasyon nedeni ile kaybedilmiştir.

Sonuç olarak karbapenemaz üreten mikroorganizmaların hem enfeksiyona hem de kolonizasyona nedeni olduğu, bu mikroorganizmaların hastane kaynaklı sporadik enfeksiyonlar kadar epidemilere de yol açtığı, özellikle OXA karbapenemaz aracılığıyla oluşan karbapenem direncinin görüldüğü bilinmektedir. Bu nedenle klebsiella türlerinde karbapenemlere karşı yüksek düzey MIC değerleri saptanmış ise eşlik eden diğer direnç mekanizmalarının da varlığı araştırılmalıdır. Suşlarımızda aminoglikozid, kinolon ve geniş spektrumlu sefalosporin direnci de saptandığından bu çoklu direnç mekanizmasının, antibiyotiklerin bakteri üzerindeki etkinliğini azalttığı ve MIC düzeyini attığı için dirençli suşların seçildiği kanaatindeyiz. Ayrıca karbapenemlere karşı fenotipik direnç saptanıp direnç geni belirlenemeyen izolatlarda direnç test sisteminde yer almayan diğer direnç genlerine bakılması gerekir. Ek olarak fenotipik ve genotipik direnç uyumsuzluğunda kullanılan yöntemlere bağlı hatalar olabilir. Bu nedenle bu yöntemlerin de standardize edilmesine ihtiyaç vardır. Enterobacteriaceae ailesine bağlı mortalite ve morbiditeyi azaltabilmek için fenotipik testlerin yanında genotipik testlerde ihtiyaç vardır, düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ

Yaptığımız çalışmada;

- Çalışma süresince 43 adet karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izole edilmiştir.
- İzole edilen suşların kliniklere göre dağılımı; cerrahi yoğun bakım servisi 32 (14), dahili yoğun bakım servisi % 30.2 (13), dahiliye servisi % 18.6 (8), KİT servisi % 14 (6), cerrahi servisi % 4.7 (2) şeklindedir.
- Materyal dağılımı; % 25.6 (11) kan kültürü ve % 25.6 (11) rektal sürüntü, % 14 (6) idrar, % 9.3 (4) batın içi mayi, % 9.3 (4) balgam, % 7 (3) trakeal aspirat, % 4.6 (2) yara, % 2.3 (1) bronkoalveolar lavaj (BAL), % 2.3 (1) plevra sıvısı seklindedir.
- Hastaların 28' i (% 65.1) erkek, 15'i (% 34.9) kadın; yaşları 3-86 aralığında olup ortalama 53.8 yıldır.
- Hastaların 10'unda karaciğer, 6'sında KİT, 2'sinde böbrek ve 1'inde kalp nakli olmak üzere 19' unda organ – kök hücre nakli öyküsü mevcuttur.
- Hastaların takibinde 25'i exitus olmuştur. Bu hastaların 9 tanesinde organ – kök hücre nakil öyküsü mevcuttur.
- İzole edilen 43 suşun % 88.4 (38)'ü *K. pneumoniae*, % 9.3 (4)'ü *E.coli* ve % 2.3 (1)'ü *K.oxytoca*'dır.
- Karbapenem duyarlılığını saptamak için yapılan disk difüzyon yöntemi ile suşların tamamı ertapeneme dirençli bulunmuştur. Suşların meropenem için % 95.3 (41)'ünde, imipenem için % 83.7 (36)'sinde direnç ya da azalmış duyarlılık saptanmıştır.
- Karbapenem MIC düzeyleri E test ve Vitek-2 olmak üzere her iki yöntemle çalışılan 43 izolatta, karbapenemler içinde en yüksek direnç ertapenemde (sırasıyla % 97.7 ve % 100 dirençli) saptanmıştır. Bunu (orta duyarlılar dirençli kabul edildiğinde) meropenem (sırasıyla % 93 ve % 90.7 dirençli) ve imipenem (sırasıyla % 79.1 ve % 88.4 dirençli) izlemiştir.
- Fenotipik testlerden Modifiye Hodge Testi çalışılan 43 suşun 35'inde (% 85) pozitif saptanmıştır. IMP/IMP+EDTA ile yapılan MBL E testi 43 izolattın 41'inde (% 95.3) negatif, 2'sinde (% 4.7) pozitif olarak değerlendirilmiştir.
- OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem disk difüzyonu ve meropenem disk difüzyonu arasında uyum saptanmamıştır (p >0.05). OXA 48 direnç geni pozitifliği ile imipenem disk difüzyonu arasında uyum saptanmıştır (p<0.05).

- OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem E test MIC, meropenem E test MIC, imipenem E test MIC arasında uyum saptanmamıştır ($p > 0.05$).
- OXA 48 direnç geni pozitifliği ile ertapenem Vitek MIC, meropenem Vitek MIC arasında uyum saptanmamıştır ($p > 0.05$). OXA 48 direnç geni pozitifliği ile imipenem Vitek MIC arasında uyum saptanmıştır ($p < 0.05$).
- Modifiye Hodge Testi pozitifliği ile OXA 48 direnç geni pozitifliği arasında kappa uyum analizi ile anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$).
- MBL E test pozitifliği ile NDM 1 direnç geni pozitifliği arasında kappa uyum analizi testi ile anlamlı ilişki bulunmuştur ($p < 0.05$).
- Ertapenem disk difüzyon ile dirençli saptanan 43 suşun E test yöntemi ile belirlenen MIC düzeylerine göre %97.7 oranında dirençli bulunurken Vitek-2 yöntemine göre %100 oranında dirençli bulunmuştur.
- Meropenem disk difüzyonu ile meropenem E test MIC ve Meropenem Vitek MIC arasında uyum mevcuttur ($p < 0.05$). Meropenem E test MIC ile Meropenem Vitek MIC arasında uyum saptanmamıştır ($p > 0.05$).
- İmipenem disk difüzyonu ile İmipenem E test MIC ve İmipenem Vitek MIC arasında uyum mevcuttur ($p < 0.05$). İmipenem E test MIC ile İmipenem Vitek MIC arasında uyum yoktur ($p > 0.05$).
- Vitek 2 ile bakılan duyarlılık paterninde 43 izolatta; amoksisilin-klavulanik asit % 100 (43), piperasilin-tazobaktam % 100 (43), seftazidim % 95.3 (43), seftriakson % 93 (41), sefepim % 81.4 (35), amikasin % 58.1 (25), gentamisin % 72.1 (31), siprofloksasin % 95.3 (41), trimetoprim-sulfamethoxazol % 79.1 (34) oranında direnç saptanmıştır.
- Ayrıca seftriakson % 2.3 (1), sefepim % 14 (6), amikasin % 18.6 (8), gentamisin % 4.7 (2) oranında orta duyarlı saptanmıştır.
- Kolistin % 11.6 (5) suşta dirençli, % 2.3 (1) suşta orta duyarlı ve % 86 (37) suşta duyarlı saptanmıştır.

7. ÖNERİLER

Karbapenemaz üreten enterik GN bakteriler tespit edildiğinde;

- Hastane kaynaklı mikroorganizmalarda GSBL ile karbapenemaz aktivitesinin birlikteliği, çoklu ilaç direnç gelişimini kolaylaştırmakta bunun sonucu olarak yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır.
- Özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi enfeksiyonlarda karbapenem duyarlılığını doğru ve mümkün olan en kısa sürede belirlemek, etken bakterinin izole edildiği hasta için yaşamsal önem taşımaktadır.
- Doğru ve çabuk laboratuvar tanısı enfeksiyon kontrolü açısından önemlidir. Daha hızlı sonuçlar için fenotipik direnç tanımlama yöntemlerine gereksinim olduğu kadar genotipik direnç tanımlama yöntemlerine de gerek duyulduğu, hastane mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu yöntemlerin de kullanımının yaygınlaştırılmasına önem verilmelidir.

Bu sonuçlar ışığında; kritik durumdaki hastalarda enfeksiyon varlığında mümkün olan en kısa sürede etken bakterinin tanımlanması, antibiyotik duyarlılığı ve direnç genlerinin tanımlanması, bu hastaların uygun şekilde izole edilmesinin ve akılcı antibiyotik kullanımının mortalitenin azalmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.

8.ÖZET

Bakterilerdeki antibiyotik direnci, tüm dünyada giderek artmaktadır. Bu dirençli kökenler enfeksiyonların tedavisinde önemli sorunlara yol açmaktadır. Yaşamı tehdit eden ciddi, çoklu ilaç direnci gösteren GN bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Bu çalışmada hastanemizde izole edilen karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması ve karbapenem direncine sebep olan genetik mekanizmaların incelenmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya toplam

43 karbapenem dirençli suş alınmıştır. Vitek-2 (bioMérieux, Fransa) sistemi ile isimlendirilmiş ve antibiyotik duyarlılıkları belirlenmiştir. Karbapenem MIC değerleri ayrıca E-test ile de çalışılmıştır. Fenotipik tanımlama için MHT ve MBL E test kullanılmıştır. Direnç genlerinden olan IMP, VIM, KPC, NDM 1 ve OXA 48 Multipleks PCR (hyplex® SuperBug ID) ile çalışılmıştır. MHT % 81.4 oranında pozitif saptanmıştır. Kırk üç suşun 7'sinde OXA 48 geni, 1'inde NDM 1 geni pozitif bulunmuş, diğerlerinde ise hiç bir direnç geni tespit edilememiştir. PCR sonuçları referans alınarak, fenotipik testlerle PCR uyumu karşılaştırılmıştır. MHT testi ile OXA 48 direnç geni pozitifliği ve MBL E test ile NDM 1 direnç geni pozitifliği arasında uyum görülmüştür ($p < 0,05$). Diğer antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç görülürken suşların %11.6'sında kolistin direnci görülmüştür. Karbapenem dirençli enterobacteriaceae izolatların hızlı ve erken tanımlanması bu çok dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların engellenmesi ve bununla ilişkili mortalite oranlarının düşmesine katkı sağlayacaktır düşüncesindeyiz.

9. SUMMARY

Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* is increasingly reported worldwide and cause therapeutic problems in health care facilities.

Carbapenems are often considered as a last therapeutic choice for the treatment of life threatening of infections due to multidrug-resistant Gram-negative rods. For that reason Carbapenem resistance is extremely important.

In the present study, It has been intended to examine the genotypic and phenotypic properties of the carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* strains that are isolated from our hospital and the genetic mechanisms that cause the carbapenem resistance. A total of 43 carbapeneme resistant strains have been included in this study. Identification and antibiotic susceptibility tests were performed by Vitek-2 system. Carbapenem MIC values were also studied by E-test. Modified Hodge Test (MHT) and MBL E test were used for phenotypic

detection, and PCR, Multiplex PCR (hyplex® SuperBug ID), by using specific primers for the detection of bla OXA-48 , bla KPC , bla NDM 1 and bla VIM type carbapenemases with specific primers were performed.

Carbapenemase production was demonstrated by modified Hodge test and 81.4 % of isolates were positive. Seven isolates of 43 were positive for blaOXA-48 and one for blaNDM-1 and there wasn't any positivity for the others.

With PCR results as reference, PCR compliance with phenotypic tests were compared. There was compatibility between OXA 48 positivity and MHT ($p < 0,05$) and MBL E test between NDM-1 resistance gene. Antimicrobial susceptibility testing showed that although carbapenem-non-susceptible strains exhibited high resistance rates to other antimicrobial agents. The rate of colistin resistance were 11.6 %.An early and quick identification of carbapenemase-producing enterobacteriaceae, is mandatory to prevent the spread of these highly resistant pathogens.

10.KAYNAKLAR

1. Bradford PA, Dean CR. Resistance of Gram negative bacilli to antimicrobials. In Fong IW, Drlica K, eds. Antimicrobial Resistance and Implications for the Twenty-First Century. New York: Springer, 2008: Pages 97-159
2. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791-1798.
3. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, Fendri C, Belhadj O, Ben-Mahrez K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol* 2003;52:427-433.
4. Poole K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004;61:2200-2223.
5. Gupta V. An update on newer beta-lactamases. *Indian J Med Res* 2007;126:417-427.
6. Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect* 2006;39:264-277.
7. Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim HS, Park YS, Yoon JB, *et al.* Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;57:85-91.
8. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, Sohn SG, Kang GH, Jeon GJ, *et al.* Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean nationwide survey. *J Clin Microbiol* 2004; 42:2902-2906.
9. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, *et al.* Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med* 2005;165:1430-1435.
10. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007;67:1027-1052.
11. Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect* 2008;14 Suppl 1:175-180.
12. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter* 2009;31:55-62.
13. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogulnc D. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009;21:383-389.
14. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007;59:453-457.
15. Einstein B I, Zalesnik D F. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell G L, Bennett J E, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles on practice of infectious diseases. 5th ed. New York: Churchill Livingstone. 2000:2294 – 2301
16. Winn Jr WC. The *Enterobacteriaceae*. In: Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Procop G, Woods GL eds. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 2007: 228-302

17. Töreci K. *Enterobacteriaceae* Genel Özellikleri. In: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M eds. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Nobel tıp kitapçevleri;2002, cilt 2:1564-1574
18. Farmer JJ, Howard BJ, Weisfield AS. *Enterobacteriaceae*. In Howard BJ, Klas J, Rubin SJ, Weisfield AS, Tilton RC, eds. Clinical and pathogenic of Microbiology. St louis: CV Mosby company; 1987;289
19. Bopp CA, Brenner FW, Fields PI, Wells JG, Strockbine NA. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RC eds. *Manual of clinical Microbiology*. 8 th ed. Washington DC: ASM press; 2003; 654.
20. Donnenberg MS. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell G, Bennett J E, Dolin R (eds). Mandell, Douglas and Bennett's Principles on Practice of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005:2567
21. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller. *Medical Microbiology*. 5 th ed. Ch 31: *Enterobacteriaceae*. Philadelphia: Elsevier mosby 2005; 323.
22. Farmer JJ. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenenbaum RC, eds. *Manual of clinical Microbiology*. 8 th ed. Washington DC: ASM press; 2003; 654.
23. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:589-603.
24. Akan E. Genel Mikrobiyoloji ve İmmunoloji. Çukurova Üniversitesi Tıp Fak. Adana: Yayın No: 16; 1992.
25. Tunçkanat F. Üriner Sistem İnfeksiyonu Patogeneğinde Bakteriyel Virulans Faktörleri. *Klinik Derg.* 1993 6:3.
26. *Escherichia, Shigella and Salmonella*. In Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA eds. *Manuals of clinical microbiology, Volume 1*. 10th ed. Washington DC: ASM Press; 2011.
27. Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. In Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi. 1999;91-108
28. Essack SY. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm Res* 2001;18:1391-1399.
29. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M, eds. Enfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. 2. baskı. Nobel tıp kitapçevleri, 2002; cilt1: sayfa182-93
30. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem* 2009;16:564-575.
31. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-1233.
32. Mouton JW, Touzw DJ, Horrevorts AM, Vinks AA. Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2000;39:185-201.

33. Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T. Comparison of two carbapenems, SM-7338 and imipenem: affinities for penicillin-binding proteins and morphological changes. *J Antibiot (Tokyo)* 1990;43:314-320.
34. Livermore DM, Sefton AM, Scott GM. Properties and potential of ertapenem. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:331-344.
35. Thomson JM, Bonomo RA. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril! *Curr Opin Microbiol* 2005;8:518-524.
36. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2013.
37. Basoli A, Meli EZ, Mazzocchi P, Speranza V. Imipenem/cilastatin (1.5 g daily) versus meropenem (3.0 g daily) in patients with intra-abdominal infections: results of a prospective, randomized, multicentre trial. *Scand J Infect Dis* 1997;29:503-508.
38. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, MacDonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics. Discovery and development of imipenem/cilastatin. *Am J Med* 1985;78:3-21.
39. Nikaido H. Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985;27:197-231.
40. Endtz HP, van Dijk WC, Verbrugh HA. Comparative in-vitro activity of meropenem against selected pathogens from hospitalized patients in The Netherlands. MASTIN Study Group. *J Antimicrob Chemother* 1997;39:149-156.
41. White R, Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:904-908.
42. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 1995;36 Suppl A:1-17.
43. Yang YJ, Livermore DM. Interactions of meropenem with class I chromosomal beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989;24 Suppl A:207-217.
44. Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora* 1997;283:3-16.
45. Gill CJ, Jackson JJ, Gerckens LS, Pelak BA, Thompson RK, Sundelof JG, *et al.* In vivo activity and pharmacokinetic evaluation of a novel long-acting carbapenem antibiotic, MK-826 (L-749,345). *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1996-2001.
46. Keating GM, Perry CM. Ertapenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. *Drugs* 2005;65:2151-2178.
47. El-Gamal MI, Oh CH. Current status of carbapenem antibiotics. *Curr Top Med Chem* 2010;10:1882-1897.
48. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from 11 North American medical centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1915-1918.
49. Yellin AE, Hassett JM, Fernandez A, Geib J, Adeyi B, Woods GL, *et al.* Ertapenem monotherapy versus combination therapy with ceftriaxone plus metronidazole for treatment of complicated intra-abdominal infections in adults. *Int J Antimicrob Agents* 2002;20:165-173.
50. Hernandez JR, Velasco C, Romero L, Martinez-Martinez L, Pascual A. Comparative in vitro activity of ertapenem against extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in Spain. *Int J Antimicrob Agents* 2006;28:457-459.
51. Saba R, Usluer G. Ertapenem *FLORA* 2008; 13(ek5): 3-19
52. Lee SC, Huang SS, Lee CW, Fung CP, Lee N, Shieh WB, *et al.* Comparative antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative bacteria from community-acquired bacteremia to ertapenem in Taiwan. *BMC Infect Dis* 2007;7:79.

53. Başaran S, Korten V. Doripenem: Klinik Uygulamada Yeni Bir Karbapenem. *Klimik Journal/Klimik Dergisi* 2010;23.
54. Bazan JA, Martin SI, Kaye KM. Newer beta-lactam antibiotics: doripenem, ceftobiprole, ceftaroline, and cefepime. *Infect Dis Clin North Am* 2009;23:983-996, ix.
55. Matthews SJ, Lancaster JW. Doripenem monohydrate, a broad-spectrum carbapenem antibiotic. *Clin Ther* 2009;31:42-63.
56. Yucesoy M, Yulug N, Kocagoz S, Unal S, Cetin S, Calangu S. Antimicrobial resistance of gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: comparison to previous three years. *J Chemother* 2000;12:294-298.
57. Usluer G. oklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora* 2002;7:135–141.
58. Cunha BA. Antibiotic resistance. *Med Clin North Am* 2000;84:1407-1429.
59. Mayer K, Opal JM H, Medeiros A. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennet JE, Dolin R eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Philadelphia: Churchill Livingstone; 1994;1015–1018
60. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:1-5.
61. Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin binding proteins. In Bryan LE, eds. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag; 1989; 77-100
62. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis Suppl* 1991;78:7-16.
63. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001;14:933-951, table of contents.
64. Sanders CC. beta-Lactamases of gram-negative bacteria: new challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992;14:1089-1099.
65. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotic resistance. *Clin Microbiol Infect* 2000;6 Suppl 3:93-94.
66. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Michael AP. Antibakteriyel İlalara Direnç Mekanizmaları. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC eds. *Klinik Mikrobiyoloji*. 9 ed. Washington DC: ASM.2009; 1114-1145.
67. Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, Yamaguchi A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 2002;419:587-593.
68. Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, *et al*. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. *J Bacteriol* 2000;182:3142-3150.
69. Bradford PA. What's New in beta-lactamases? *Curr Infect Dis Rep* 2001;3:13-19.
70. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:259-263.
71. Gr D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi* 1996;1: 80–86.
72. Gr D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu WA, Söyletir G, Doğanay M. eds. *İnfeksiyon hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. Nobel tıp kitapçevleri; 2008. Cilt,1: 243-257
73. Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs* 2010;70:313-333.
74. Yce A. Antimikrobik İlalara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klimik Dergisi* 2001; 14(2):42-46

75. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:223-232.
76. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15-22.
77. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:763-765.
78. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother* 2008;62:1257-1260.
79. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20:440-458, table of contents.
80. Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., et al. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3035-3039.
81. Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4760-4762.
82. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005;18:306-325.
83. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:373-383.
84. Ambler RP, Coulson AF, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, Forsman M, et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J* 1991;276 (Pt 1):269-270.
85. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:1262-1270.
86. Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:755-758.
87. Gales AC, Biedenbach DJ, Winokur P, Hacek DM, Pfaller MA, Jones RN. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f beta-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;39:125-127.
88. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3485-3487.
89. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003;9:999-1002.
90. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:776-778.
91. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007;60:470-482.

92. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1151-1161.
93. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4423-4424.
94. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:2880-2882.
95. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:3098-3101.
96. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H, *et al.* Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect* 2009;58:213-219.
97. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004;39:55-60.
98. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 2005;56:128-132.
99. Woodford N, Tierno PM, Jr., Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4793-4799.
100. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008;46:4083-4086.
101. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:622-632.
102. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2247-2253.
103. Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:2148; author reply 2148-2150.
104. Jacoby GA. Beta-lactamase nomenclature. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1123-1129.
105. Poirel L, Brinas L, Fortineau N, Nordmann P. Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:3593-3597.

106. Jeong SH, Bae IK, Kim D, Hong SG, Song JS, Lee JH, *et al.* First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:4809-4810.
107. Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2344-2345.
108. Duarte A, Boavida F, Grosso F, Correia M, Lito LM, Cristino JM, *et al.* Outbreak of GES-1 beta-lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1481-1482.
109. Kartali G, Tzelepi E, Pournaras S, Kontopoulou C, Kontos F, Sofianou D, *et al.* Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated beta-lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1577-1580.
110. Pasteran F, Faccione D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vazquez M, *et al.* Novel variant (bla(VIM-11)) of the metallo- β -lactamase bla(VIM) family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:474-475.
111. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2002;49:561-565.
112. Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- β -lactamases. *J Bacteriol* 1991;173:4611-4617.
113. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6 beta-lactamase II structural gene. *J Bacteriol* 1988;170:2873-2878.
114. Chen Y, Succi J, Tenover FC, Koehler TM. Beta-lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol* 2003;185:823-830.
115. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, *et al.* Sequence analysis of the L1 metallo- β -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:199-201.
116. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio ML, Galleni M, *et al.* Cloning of a *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum* chromosomal gene (blaA(CME)) encoding an extended-spectrum class A beta-lactamase related to the *Bacteroides cephalosporinases* and the VEB-1 and PER beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:2193-2199.
117. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamases from *Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:3028-3034.
118. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, Henriques I, Alves A, Correia A. Sfh-I, a subclass B2 metallo- β -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2330-2333.
119. Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1460-1464.
120. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-151.

121. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, *et al.* Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:71-78.
122. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, *et al.* A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1612-1615.
123. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo-beta-lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1343-1348.
124. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, *et al.* Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43:1584-1590.
125. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A, *et al.* Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase. *J Clin Microbiol* 2002;40:4051-4055.
126. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:167-172.
127. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis* 2000;6:84-85.
128. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo-beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:257-266.
129. Lagatolla C, Tonin EA, Monti-Bragadin C, Dolzani L, Gombac F, Bearzi C, *et al.* Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo-beta-lactamase determinants in European hospital. *Emerg Infect Dis* 2004;10:535-538.
130. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, *et al.* Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004;54:282-283.
131. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, *et al.* Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2224-2228.
132. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant (bla(VIM-4)) of the metallo-beta-lactamase gene bla(VIM-1) in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:4026-4028.
133. Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:673-679.
134. Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene bla(SPM-1)-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:1406-1409.
135. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:582-587.

136. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:5046-5054.
137. Hsueh PR. New Delhi metallo-ss-lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among *Enterobacteriaceae*. *J Formos Med Assoc* 2010;109:685-687.
138. Nataraj G. New Delhi metallo beta-lactamase: what is in a name? *J Postgrad Med* 2010;56:251-252.
139. Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:268-273.
140. Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended-spectrum class 2d' beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:2859-2863.
141. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:196-199.
142. Afzal-Shah M, Livermore DM. Worldwide emergence of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* *J Antimicrob Chemother* 1998;41:576-577.
143. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, *et al.* Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter sp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:4114-4123.
144. Brown S, Amyes S. OXA (beta)-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far. *J Antimicrob Chemother* 2006;57:1-3.
145. Poirel L, Heritier C, Nordmann P. Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:348-351.
146. Poirel L, Heritier C, Nordmann P. Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B beta-lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). *J Antimicrob Chemother* 2005;55:680-685.
147. Kong KF, Jayawardena SR, Del Puerto A, Wiehlmann L, Laabs U, Tummeler B, *et al.* Characterization of poxB, a chromosomal-encoded *Pseudomonas aeruginosa* oxacillinase. *Gene* 2005;358:82-92.
148. Schneider I, Queenan AM, Bauernfeind A. Novel carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-62 from *Pandoraea pnomenusa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1330-1335.
149. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:202-208.
150. Ledent P, Raquet X, Joris B, Van Beeumen J, Frere JM. A comparative study of class-D beta-lactamases. *Biochem J* 1993;292 (Pt 2):555-562.
151. Maveyraud L, Golemi-Kotra D, Ishiwata A, Meroueh O, Mobashery S, Samama JP. High-resolution X-ray structure of an acyl-enzyme species for the class D OXA-10 beta-lactamase. *J Am Chem Soc* 2002;124:2461-2465.
152. Paetzel M, Danel F, de Castro L, Mosimann SC, Page MG, Strynadka NC. Crystal structure of the class D beta-lactamase OXA-10. *Nat Struct Biol* 2000;7:918-925.

153. Girlich D, Naas T, Nordmann P. OXA-60, a chromosomal, inducible, and imipenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Ralstonia pickettii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4217-4225.
154. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, *et al.* Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:1369-1373.
155. Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:583-588.
156. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;49:5-11.
157. Mete A. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve PCR-RFLP ile tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. *Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*;Ankara. 2005.
158. Church DL, Chow BL, Lloyd T, Gregson DB. Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;69:30-37.
159. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol* 2002;40:2119-2125.
160. Huang YC, Su LH, Wu TL, Liu CE, Young TG, Chen PY, *et al.* Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2004;42:307-310.
161. Us E, Tekeli A, Arikan Akan O, Dolapci I, Sahin F, Karahan ZC. [Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated between 2004-2007 in Ankara University Hospital, Turkey]. *Mikrobiyol Bul* 2010;44:1-10.
162. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007;2:501-512.
163. Matar GM, Cuzon G, Araj GF, Naas T, Corkill J, Kattar MM, *et al.* Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect* 2008;14:887-888.
164. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3463-3464.
165. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, *et al.* Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:84-88.
166. Perçin D ÇS, Durmaz S, Ekincioglu P. Rektal Sürüntü Örneklerinde Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Taranmasında Klasik Yöntemlerle Ertapenemli EMB Besiyerinin Karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012;46(4).
167. Yanik K, Emir D, Eroglu C, Karadag A, Guney AK, Gunaydin M. [Investigation of the presence of New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) by PCR in carbapenem-resistant gram-negative isolates]. *Mikrobiyol Bul* 2013;47:382-384.

168. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54:101-106.
169. Perez F, Van Duin D. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a menace to our most vulnerable patients. *Cleve Clin J Med* 2013;80:225-233.
170. Saidel-Odes L, Borer A. Limiting and controlling carbapenem-resistant. *Infect Drug Resist* 2013;7:9-14.
171. Kalpoe JS, Sonnenberg, E., Factor, S. H., del Rio Martin, J., Schiano, T., Patel, G. and Huprikar, S. Mortality associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections in liver transplant recipients. *Liver Transpl* 2012;18:468-474.
172. Viale P, Giannella M, Lewis R, Trecarichi EM, Petrosillo N, Tumbarello M. Predictors of mortality in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013;11:1053-1063.
173. Hussein K, Raz-Pasteur A, Finkelstein R, Neuberger A, Shachor-Meyouhas Y, Oren I, et al. Impact of carbapenem resistance on the outcome of patients' hospital-acquired bacteraemia caused by *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 2013;83:307-313.
174. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008;29:1099-1106.
175. Nguyen M, Eschenauer GA, Bryan M, O'Neil K, Furuya EY, Della-Latta P, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;67:180-184.
176. Korten V, Söyletir G, Yalçın A. Karbapenemlerin gram negatif patojenlere karşı in vitro aktivitelerinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi: COMPACT çalışması Türkiye verisi. *Mikrobiyol Bül.*2011; 45(2): 197-209
177. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007;45:2723-2725.
178. PA. Wayne. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; update CLSI document M100-S20. *Clinical and Laboratory Standards Institute*. June 2010.
179. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:3881-3889.
180. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, et al. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol* 2010;48:4417-4425.
181. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta- lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 2011;49:4301-4303.
182. Raghunathan A, Samuel L, Tibbetts RJ. Evaluation of a real-time PCR assay for the detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in microbiological samples in comparison with the modified Hodge test. *Am J Clin Pathol* 2011;135:566-571.
183. Ramana KV, Rao R, Sharada Ch V, Kareem M, Reddy LR, Ratna Mani M. Modified Hodge test: A useful and the low-cost phenotypic method for detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* members. *J Nat Sci Biol Med* 2013;4:346-348.

184. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, *et al.* A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol* 2013;51:2986-2990.
185. Alışkan HE, Çolakoğlu Ş, Bostanoğlu E, Turunç T, Göçmen Js. İki Yıllık Süreçte Yapılan Modifiye Hodge Testi Sonuçlarının İrdelenmesi. *Ankem Derg* 2011;25:169-172.
186. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 2010;36:205-210.
187. Dizbay M, Tunccan OG, Karasahin O, Aktas F. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella spp.* infections in a Turkish university hospital: epidemiology and risk factors. *The Journal of Infection in Developing Countries* 2014;8:044-049.
188. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and rapid regional spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis* 2011;53:532-540.
189. Teo J, Cai Y, Tang S, Lee W, Tan TY, Tan TT, *et al.* Risk factors, molecular epidemiology and outcomes of ertapenem-resistant, carbapenem-susceptible *Enterobacteriaceae*: a case-case-control study. *PLoS One* 2012;7:e34254.
190. Nazik H, Bektöre B, Öngen B, Özyurt M, Yazici H, Baylan O, *et al.* Determination of *Escherichia coli* and *Citrobacter koseri* Isolates with OXA-48 Carbapenemase in İstanbul. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 2011;31:1502-1506.
191. Baroud M, Dandache I, Araj GF, Wakim R, Kanj S, Kanafani Z, *et al.* Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41:75-79.
192. Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, *et al.* Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:89-96.
193. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, *et al.* Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:317-321.
194. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, *et al.* OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:2546-2551.
195. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1597-1606.
196. Adler A, Shklyar M, Schwaber MJ, Navon-Venezia S, Dhaher Y, Edgar R, *et al.* Introduction of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* to Israeli hospitals by medical tourism. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2763-2766.
197. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2012;67:1660-1665.
198. Chung KP, Tseng SP, Huang YT, Tsai TH, Teng LJ, Hsueh PR. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan. *J Antimicrob Chemother* 2011;66:1182-1184.

199. Lauderdale TL, Shi ZY, Lin CF, Lai JF, Tan MC, Wang JT, *et al.* KPC-2-producing sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* detected in Taiwan. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2207-2208.
200. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9:228-236.
201. Chiu SK, Wu TL, Chuang YC, Lin JC, Fung CP, Lu PL, *et al.* National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One* 2013;8:e69428.
202. Ma L, Siu LK, Lin JC, Wu TL, Fung CP, Wang JT, *et al.* Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan. *BMC Infect Dis* 2013;13:599.
203. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:2784-2785.
204. Alp E, Percin D, Colakoglu S, Durmaz S, Kurkcu CA, Ekincioglu P, *et al.* Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect* 2013;84:178-180.
205. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, *et al.* Spread of NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* in a Neonatal Intensive Care Unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2929-2933.