



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENTEROBACTERIACEA TÜRLERİNDE
KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN FENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Emin GULUZADE

**Samsun
OCAK-2019**



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ENTEROBACTERIACEA TÜRLERİNDE
KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN FENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Emin GULUZADE

Danışman

Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ

**Samsun
OCAK-2019**

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, hoşgörü ortamı içerisinde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda destek ve yardımlarını gördüğüm, eğitimime büyük katkıları olan, başta tez danışmanım ve bölüm başkanımız sayın Prof.Dr. Asuman BİRİNCİ olmak üzere, Prof.Dr. Belma DURUPINAR'a, Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI'ya ve Yrd. Doç. Dr. Kemal Bilgin'e çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalıştığım ve çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma ve mikrobiyoloji laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim canım annem ve babama, kardeşlerime, desteği ve sevgisiyle her an yanımda olan eşime sonsuz teşekkür ederim.

Bu çalışma, PYO.TIP.1904.17.014 proje numarası ile Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

ÖZET

ENTEROBACTERIACEA TÜRLERİNDE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN FENOTİPİK YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Amaç: *Enterobacteriaceae spp* sık karşılaşılan gram negatif etkenlerdir. Dirençli türler karbapenem kullanımını ve direnç gelişimini arttırmaktadır. Bu direncin tespiti önem arz etmektedir. Mevcut metodların sensitivite ve spesifite düşüklüğü yeni metodların geliştirilmesine neden olmuştur. Amacımız karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemaz varlığını fenotipik yöntemlerle incelemek, fenotipik ve moleküler yöntemlerin arasında, fenotipik yöntemlerin kendi aralarında uyumluluğu incelemektir.

Materyal ve Metod: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen ve karbapenem direnç geni tespit edilmiş 70 *Enterobacteriaceae* suşu çalışmaya dahil edildi. Çalışmaya ayrıca karbapenem dirençli olan ancak direnç geni tespit edilmeyen negatif kontrol olarak 40 *Enterobacteriaceae* dahil edildi. Suşlarda karbapenemaz tespiti için Modifiye Hodge Testi (MHT), Kromojenik test, CarbaNP testi ve MAST disk testleri kullanıldı. Elde edilen sonuçlarla fenotipik testlerin sensitivite, spesivite, pozitif ve negatif prediktif değerleri hesaplandı.

Bulgular: Çalışmaya dahil edilen 110 suştan 78 (%70,9)'inde MHT pozitif, 32 (%29,1)'i negatif, CarbaNP testiyle 82 (%74,5)'si pozitif, 28 (%25,5) suş negatif, kromojenik besiyeri testi ise 73 (%66,4) suşu pozitif, 37 (%33,6) suşu negatif bulunmuştur. 110 suşta MAST disk test sonucuna göre 74(%67,3) suş pozitif, 13(%32,7) suş negatif bulunmuştur. PZR pozitif suşların 67 (%95,7)'sinde MAST disk pozitiflik saptandı ve en fazla OXA-48 (%87,1) karbapenemaz türü saptandı. Dört farklı metodu karşılaştırdığımızda sırası ile sensitivite, spesifiteleri, PPD ve NPD'leri en yüksek olan testler CarbaNP ile MAST disk olmuştur.

Sonuç: Karbapenem MİK değerlerinde artış saptanan izolatlarda bu artışın doğrulanması ve hastane içinde, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* prevalansının arttığı birimlerde taşıyıcılık taraması yapılması mantıklı görünmektedir.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*; Fenotipik testler; Karbapenem direnci; Karbapenemazlar

**Emin GULUZADE, Doktora Tezi
Ondokuz Mayıs Üniversitesi-Samsun, Ocak-2019**

ABSTRACT

INVESTIGATION OF CARBAPENEMASE PRODUCTION IN *ENTEROBACTERICEAE* SPECIES BY PHENOTYPIC METHODS

Aim: *Enterobacteriaceae* is the most encountered gram negative pathogen. Resistant species increasing carbapenem use and therefore resistance. Detection of this resistance is crucial. Low sensitivity and specificity of known methods forced to develop new methods. Aim of our study is to investigate phenotypic methods on carbapenemase resistant *Enterobacteriaceae* isolates, to compare phenotypic and molecular methods, also evaluate phenotypic tests amongst themselves.

Material and Method: 70 genotypically positive *Enterobacteriaceae* strain included to study that has been isolated in OMU Medical Faculty Microbiology Laboratory. 40 *Enterobacteriaceae* are also included as a negative control. Carbapenemase production tested using Modified Hodge Test, Chromogenic test, CarbaNP test and MAST Disc test. Results used to calculate sensitivity, specificity, positive predictive and negative predictive values of phenotypic tests

Results: 78 (%70,9) from investigated 110 strains MHT was positive and 32 (%29,1) was negative, CarbaNP detected 82 (%74,5) as positive, 28 (%25,5) as negative, results from Chromogenic Medium showed 73 (%66,4) as positive and 37 (%33,6) as negative. Total 110 isolate showed 74(%67,3) positive, 13(%32,7) negative results on MAST Disk test. Among PCR positive isolates 67(%95,7) MAST disk detected as positive and showed OXA-48 (%87,1) type carbapenemases. Comparing four different methods CarbaNP and Mast disk method showed highest sensitivity, specificity, positive and negative predictive values accordingly.

Conclusion: Confirmation of elevated carbapenem MIC results and hospital screening for vectors especially in departments with high prevalence of carbapenem resistance seems rational

Keywords: Carbapenem resistance; Carbapenemases; *Enterobacteriaceae*; Phenotypic tests

Emin GULUZADE, Ph. D. Thesis
Ondokuz Mayıs University-Samsun, January-2019

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
APBA	: 3-Aminofenilboronik Asit
CDC	: Center for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
ÇDST	: Çift Disk Sinerji Testi
ÇİD	: Çoklu İlaç Direnci
DHP-I	: Dehidropeptidaz-I
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DPA	: Dipikolinik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EMB	:Eosin Methylene Blue
EUCAST	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	:US Food and Drug Administration
GİM	: German İmipenemase Metallobetalaktamaz
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Betalaktamaz
GSBL	:Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
KDDT	: Kombine Disk Difüzyon Testi
KİT	: Karbapenemaz İnaktivasyon Testi
KÜE	:Karbapenemaz Üreten Enterobacteriaceae
M	:Molar

MALDI-TOF: Matrix-Assisted Laser Desorption İonization-Time of Flight

MBL	: Metalo-Beta-Laktamaz
MDR	: Multi Drug Rezistance
MHA	: Muller Hinton Agar
MHT	: Modifiye Hodge Testi
MIK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MİO	: Motilite İndol Ornitin
mRNA	: mesajcı Ribonükleik asit
MRSA	: Metisilin-Rezistan S. aureus
NAG	: N-Asetilglukozamin
NAM	: N-Asetilmuramik Asit
NDM	: New Delhi Metallobetalaktamaz
OMP	: Dış Membran Proteini
OMP	: Outer Membran Protein
PBA	: Fenilboronik Asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PDR	: Pan Drug Rezistance
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SF	: Serum Fizyolojik
SIM	: Seoul İmipenemase Metallobetalaktamaz
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
tRNA	: taşıyıcı Ribonükleik asit

TSI	: Triple Sugar Iron
VIM	: Verona İntegronla Kodlanan Metallobetalaktamaz
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni
XDR	: Extreme Drug Rezistance
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
MI	: Mikrolitre



İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR	V
İÇİNDEKİLER	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> spp.	3
2.1.1. Genel Özellikleri	3
2.1.2. Taksonomi	3
2.1.3. Morfolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri	5
2.1.4. <i>Enterobacteriaceae</i> Türlerinin Genel Virülans Faktörleri	6
2.1.5. Endotoksin	7
2.1.6. Ekzotoksin	7
2.1.7. Adhezinler ve Kapsül	7
2.1.8. Epidemiyoloji	8
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> Türlerinin Laboratuvar Tanısı	10
2.2.1. Kültür	10
2.2.2. Türlerin Tanımlanması	10
2.3. <i>Enterobacteriaceae</i> Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonların Tedavisi	11
2.3.1. Antibyotiklere Duyarlılık	11
2.3.2. Antibyotiklere Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları	12
2.3.3. Aminoglikozid Direnci	12
2.3.4. Kinolon Direnci	12

2.3.5. Polimiksin Direnci	13
2.3.6. Beta-Laktam Direnci.....	13
2.3.7. Ambler sınıflamasına göre Beta laktamazlar	14
2.4. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Yöntemler	16
2.4.1. Modifiye Hodge Testi	17
2.4.2. İnhibitör Bazlı Testler	17
2.4.3. MAST Disk MastID Testi.....	18
2.4.4. Biyokimyasal metotlar – CarbaNPTesti	19
2.4.5. Karbapenemaz Aktivitesinin Spektrofotometri ile Tayini	19
2.4.6. Kromojenik Besiyerleri.....	19
2.5. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Genotipik Yöntemler	20
3. MATERYAL VE METOT	21
3.1. Bakterilerin Eldesi ve Tanımlanması	21
3.1.1. Modifiye Hodge Testi	22
3.1.2. CarbaNP Testi	23
3.1.3. MAST ID Mast Disk Testi.....	24
3.1.4. Kromojenik Besiyerleri.....	25
3.2 Kalite Kontrol.....	26
3.3. Gereçler	26
3.4. Besiyerleri	29
4. BULGULAR	31
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR	44
ÖZGEÇMİŞ	51

1. GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesinin toprakta, sulara, bitkilerde, hayvan ve insanda olmak üzere oldukça yaygın bir yaşam alanı vardır. Elliden fazla cins ve yüzlerce bakteri türü bu ailede bulunmaktadır. Bu aile insanda hastane ve toplumsal kökenli olmak üzere önemli klinik tablolara neden olan en geniş bakteri topluluğu olarak kabul görmektedir. Bu topluluk içinde fırsatçı patojen (*Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ve primer patojen (*Shigella spp*, *Salmonella spp*) olarak adlandırılan türler bulunmaktadır. Bu türler bireylerde normal komensal flora üyesi olarak fırsatçı veya doğal rezervuarlarından bulaşarak hastalık oluşturmaktadır. Bu hastalıklar toplumda ve hastanede yatan hastalarda da ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisi günümüzde antibiyotiklere karşı giderek artan direnç nedeniyle zorlaşmakta. Bununla beraber son zamanlarda klinik kullanımda olan neredeyse bütün antibiyotiklere dirençli türlerin de olması toplum sağlığı açısından ciddi tehdit oluşturmaktadır. Dirençli türler çeşitli nedenlerle kazandıkları bu özelliklerini diğer bakterilere aktararak direncin yayılmasına neden olmaktadır. Bu türlerde gelişen direnç *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemlerin (imipenem, meropenem) yoğun kullanımına neden olmuştur. Karbapenemler *Enterobacteriaceae* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en etkili ilaç grubudur. Bu antibiyotiklerin klinik kullanımının girmesiyle gelişen dirençli enfeksiyonlarda kullanılacak tedavi alternatiflerini ciddi anlamda kısıtlamıştır (Murray PR, 2008).

Bakteri türleri arasında direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla *Enterobacteriaceae* 'larda karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında doğru bir şekilde tespit edilmesi gerekmektedir. Moleküler yöntemler en güvenilir yöntem olmakla birlikte, alternatif olabilecek sensitivite ve spesifitesi yüksek, daha ucuz ve kolay yeni metodların geliştirilmesine çalışılmaktadır (Murray PR, 2008; Lee Y, 2012; Rood 2017). Çalışmamızın amacı karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemaz varlığını fenotipik yöntemlerle incelemek, fenotipik ve moleküler yöntemlerin arasındaki ve farklı fenotipik yöntemlerin kendi aralarındaki uyumluluğu incelemek, optimum fenotipik yöntemi rutin laboratuvar kullanımına önermektir.

Bu çalışmayla bölgemizde *Enterobacteriaceae* türlerinde görülen karbapenemaz direncini saptamada kullanılan fenotipik yöntemlerden ucuz, hızlı ve doğru sonuç verebilme kapasitelerini altın standart yöntemle kıyaslayarak ucuz, pratik ve güvenilir yöntemin belirlenip klinik kullanıma sunulma imkânımız olmuştur. Bunun yanında hastanemizin karbapenem direnç profili hakkında bulgulara ulaşılmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae* spp.

2.1.1. Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesi önemli klinik tablolara neden olan en geniş bir bakteri topluluğudur. Elliden fazla cins ve yüzlerce bakteri türü bu aileye dahil edilmiştir. Özellikle moleküler tekniklerinde bakterilerin tanımlanmasında kullanıma girmesiyle birçok yeni tür keşfedilmiş ve bu aileye dahil edilmiştir. Bu aileye ait bakteriler gram negatif yapıya sahip olup basit besiyerlerinde kolayca üreyebilirler. Bununla birlikte bu aile içinde üretilmesi zor olan bakteri türleri de tanımlanmıştır. D-glikoz ve diğer şekerleri sıklıkla gaz oluşturarak fermente ederler. Bu aileye ait bakteriler katalaz pozitif ve oksidaz negatiftirler. Nitratları nitritlere indirgerler ve DNA içeriğinde Guanin+Sitozin (G+C) oranı %39-59 olarak bazı özellikleri vardır (Murray PR, 2008).

Enterobacteriaceae ailesi dış ortamda yaygın olmakla beraber toprakta, sularda, bitkilerde, yiyecek, hayvan ve insan vücudunda oldukça yaygın bir yaşam alanı olmakla yanısıra bu türler içinde özel ve kısıtlı yaşam alanı olan türler de tanımlanmıştır. *Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia* cinsi bakteriler hareketsiz, sporsuzdurlar. Bazı türler ise peritriş flagellaları ile hareketlidir. Aileye ait bazı cinsler (*Salmonella*, *Shigella*) safra tuzlarına direnç göstermeleriyle enterik patojenlerden kolaylıkla ayırt edilebilmekte. Kapsül üreten suşlarla beraber kapsülsüz, diffuz ince slime tabakayla kaplı suşlar da vardır. Fırsatçı patojen (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) ve primer patojen türler (*Shigella* spp, *Salmonella* spp) vardır. Bu aileye ait çeşitli türler bireylerde normal komensal flora üyesi olarak fırsatçı veya hayvan rezervuarlarından bulaşarak hastalık oluşturmakta (Murray PR, 2008; Jawetz, 2016).

2.1.2. Taksonomi

Enterobacteriaceae ailesinin tanımlama ve klasifikasyonunda yakın zamanlara kadar biyokimyasal özellikler ön plandaydı. Ancak günümüzde genetik ve fenotipik gibi özelliklere dayalı ileri teknikler kullanarak bu türlerin tanımlanması gerçekleşmiştir. Bu yeni metotların uygulanmasıyla eskiden tanımlanan birçok bakterinin yeniden sınıflandırılması yapılmıştır. Nükleik asit hibridizasyon ve sekans analizi gibi moleküler

yöntemlerle sadece klasifikasyon yapılmayıp türlerin yeniden doğru ve güvenilir tanımlanmasına imkan tanımıştır. Bütün bu yeni tekniklere rağmen halen adlandırılmamış türler de vardır. *Enterobacteriaceae* ailesine 40 dan fazla cins ve ortalama 170 tür dahildir. *Enterobacteriaceae* ailesindeki önemli cinsler: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia* olarak sıralanmaktadır (Murray PR, 2008; Kumar 2012; Jawetz 2016).

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Sınıflandırması

Familya	Cins	Tür
<i>Escherichieae</i>	I. <i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. blatae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i>
	II. <i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>
<i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i> , <i>E. hoshina</i> , <i>E. ictaluri</i>
<i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. enteridis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. pullorum</i>
<i>Citrobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>
<i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozanae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. omithinolytica</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. dissolvens</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. nimipressuvali</i> , <i>E. nimipressuvalis</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> <i>H. alvei</i> <i>S. marcencens</i> , <i>S. lique</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. ficaria</i>

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Sınıflandırması(devam)

Familya	Cins	Tür
	<i>Hafnia</i>	
	<i>Serratia</i>	
<i>Proteeae</i>	<i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis, P. vulgaris, P. pennei, P. myxofaciens</i>
	<i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
	<i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens, P. stuartii, P. rettgeri, P. rustigianii</i>
<i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Y. pseudotuberculosis, Y. pestis, Y. enterocolitica, Y. frederiksenii, Y. kristensenii, Y. intermedia, Y. ruckeri, Y. aldovae</i>
<i>Erwinieae</i>	<i>Erwiania</i>	<i>E. amylovora, E. carotovora</i>
Herhangi bir aile içine yerleştirilmemiş cinsler	<i>Arsenophonus</i>	
	<i>Budvicia</i>	
	<i>Buttiauxella</i>	
	<i>Kluyvera</i>	
	<i>Leclercia</i>	
	<i>Leminorella</i>	
	<i>Moellerella</i>	
	<i>Obesumbacterium</i>	
	<i>Pantoea</i>	

Kaynak: Murray(2008); Kumar(2012)

2.1.3.Morfolojik, Metabolik ve Kültür Özellikleri

Enterobacteriaceae türleri bakteriler 0.3-1 µm en ve 0.6-6 µm boyutlarında fakültatif anaerobik oksidaz negatif, katalaz pozitif, aerop gram negatif

mikroorganizmalardır. Kültür ve örneklerden hazırlanan yaymalarda gram negatif, çomak şeklinde boyanırlar. Bir kısmı polisakarit kapsüllü olmakla birlikte flagellası ile hareketli olup çoğunluğu kapsülsüz ve hareketsizdir. Indol, üç şekerli demirli besiyeri (TSI) oksidatif fermentatif besiyerinde asit oluştururlar (Murray PR, 2008; Jawetz 2016).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan %5 koyun kanlı agar, eozin-metilen blue (EMB) agar, triptik soy agar ve MacConkey besiyerlerinde kolay ürerler. Koyun kanlı agarda 0,5-2 mm çapında, şeffaf veya opak, zeminden kabarık koloniler oluştururken, Mac Conkey agarda siyah, veya pembe renkte koloniler oluşturan türler vardır (Murray PR, 2008; Greenwood, 2012; Jawetz, 2016).

Kültürlerde bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilen seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden farklı kimyasallar kullanılarak SS agar gibi özel besiyerler kullanılabilir. *Klebsiella* gibi üriner sistem hastalıklarına neden olan bazı izolatlar üreme için sistein gerektirebilir. Bu durumdan dolayı identifikasyon için kullanılan besiyerlerine 0.64 mM sistein ilavesi önerilmekte. Kapsüllü türler kolonilere M koloni şeklinde üremektedir. Bu cinse ait türler üreyi yavaş hidrolize eder ve Christensen Üre agarda parlak pembe renk oluşumuna neden olurlar (Murray PR, 2008; Jawetz, 2016).

Bakterilerin karbon kaynaklarının asimilasyon özellikleri, onların yarı otomatize ve otomatize sistemlerle tanımlanmasında kullanılmaktadır. Ekilmiş plakların üremeleri için enkübyasyon geniş bir ısı yelpazesinde (25-37°C) olmakla birlikte laboratuvarında optimum üretim için 37 °C uygulanmakta (Murray PR, 2008; Greenwood, 2012).

2.1.4. *Enterobacteriaceae* Türlerinin Genel Virülans Faktörleri

Enterobacteriaceae cinsine ait olan bakteriler yüksek virülans potansiyeline sahiptir. Virülans özellikleri taşıdıkları antijenik yapılara bağlıdır. Bu antijenik yapılar aynı zamanda epidemiyoloji ve sınıflandırmada da önemli rol almaktadır. Somatik O, kiplik ve flagella H, kapsül K, bunlardan bazılarıdır. Bunlara ek olarak bütün aileye ait diğer üyelerde de ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen) antijeni vardır. Bu grup içinde tüm aileye veya her bir suşa ayrı ayrı özel çeşitli virülans faktörleri tanımlanmıştır. Bu virülans faktörlerinin kromozomal, plazmid ve faj DNA'sında bulunmakta, bakteriler arası aktarılabilir (Murray PR, 2008; Kumar, 2012).

2.1.5.Endotoksin

Gram neaktif aerobik ve bazı anaerobik bakterilerde ortak olan bu yapı *Enterobacteriaceae* ailesinde virülans faktörüdür. Toksin özelliği taşıyan bu yapı bakterilerin neden olduğu enfeksiyonun sistemik bulgularında önemli rol almakta. Bu yapı bakteriyi olumsuz dış ortam etkilerinden (çeşitli deterjanlar, safra tuzları, metilen mavisi) korumaktadır. Lipopolisakarit (LPS) yapıya sahiptir; lipid A, fosforillenmiş ve tekrarlayan yan oligosakkarit zincirleri içerir. Bakteriler arasında serogrup tiplendirmede esas alınan O antijeni bu tekrarlayan oligosakkarit zincirlerdir. Bakteri ölümüyle ortama salınan yüksek miktardaki endotoksine karşı konağın reaksiyonu Jarex Hexamer reaksiyonu olarak adlandırılmıştır (Murray PR, 2008; Jawetz, 2016).

2.1.6.Ekzotoksin

Protein yapısında olup bakterilerce ortama salınan biyoaktif bir yapıdır. Hedef hücrelere etkili, spesifik özellikleri olan toksik özelliği gösteren yapılardır. Enterotoksinler, Shigatoksin ve Shigatoksin benzer toksinler hemolizinler ve sideroforlar vb. ekzotoksinlerdir (Murray PR, 2008; Kumar, 2012).

2.1.7.Adhezinler ve Kapsül

Enterobacteriaceae ailesinin birçok üyesinde var olan, konak hücrelerine doğrudan etkili, hücre yüzeyine tutunmayı, hücre içine girmeyi ve fagositozdan korunmayı sağlayan yapılardır. Kapsül bakteriyi fagositozdan korur ve oldukça zayıf immunojenidir. Kapsül ve adhezinlerden başka bakteri dış yüzeyinde protein parçacıkları heliks şeklinde birleşerek fimbrialar ve pilusları oluşturmaktadır. Bu yapılar enfeksiyonun patogenezinde ilk basamak olan bakteriyel tutunmayı ve ortamda hareketi olanaklı kılar. Aynı zamanda piluslar bakteriler arasında genetik materyelin geçişine de neden olmaktadır (Murray PR, 2008; Kumar, 2012; Jawetz, 2016).

K. pneumoniae' nin en önemli virülans faktörü onun polisakkarit kapsül yapısıdır. Bakterinin mukoid koloni tipini belirleyen kapsül 70 farklı antijenik yapı göstermektedir (Kumar 2012).

Escherichia coli için geniş kapsamda virülans faktörleri tanımlanmış olup ortak virülans faktörlerine ilaveten bazı özel virülans faktörleri de bildirilmiştir. Bu virülans

faktörlerinin genetik materyallerle (plazmid ve bakteriyofaj DNA sı) alındığı kanıtlanmıştır. Tablo 2 de *E.coli* türlerine ait bazı virülans faktörleri gösterilmiştir.

Tablo 2. *E.coli*'nin bazı virülans faktörleri

Bakteri	Adhezinler	Ekzotoksinler
EAEC	Aggregatif adherence fimbria (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Enteroaggregatif ısıya dayanıklı toksin (EAST); Plazmid tarafından kodlanan toksin (Pet)
EPEC	“Bundle-forming pili” (Bfp) ; intimin	
ETEC	Kolonizasyon faktör antijenleri (CFA/I, CFA/II, CFA/III)	Isıya duyarlı toksin (LT-1); Isıya dayanıklı toksin (STa)
EHEC	Bfp; intimin	Shiga toksin (Stx-1, Stx-2)
EIEC	İnvaziv plazmid antijen (Ipa)	Hemolizin (HlyA)
Üropatojenler	P pili; fimbri	

Kaynak:Kumar (2012); Mainii J (2013)

2.1.8.Epidemiyoloji

Dış ortamda yaygın bulunan mikroorganizmalar olarak toprakta, suda, bitkilerde, hayvanlarda ve insan barsak florasının üyesi olarak bulunmaktadır. Birçok hastalıklara neden olan bu bakteriler bütün bakteriyemi olgularının 1/3 kısmından, üriner sistem enfeksiyonlarının %70'inden daha fazlasından sorumludurlar. Bazı üyeleri sırf patojen olarak bilinse de normal flora üyeleri de vardır ki oportunistik enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu bakterilerin bir kısmı normal bireylerde orofarinkste nadir bulunurken hastanede yatanlarda %20 civarında görülmektedir. Dışkının en önemli bulaş kaynağı olduğu düşünülmektedir. Karaciğer apsesi oluşturan önemli etkenlerin arasında yer almaktadır. Nekroz ve kanamayla seyeden pnömoni vakaları sık görülmektedir. Pnömoni genellikle deskriptif seyretme eğilimindedir.

Akciğer absesi, kaviter lezyonlar sık görülür. Ekstrapulmoner olarak enterit, menenjit, üriner sistem enfeksiyonları septisemiye neden olabilmektedirler.

2.1.9. Klinik Tablolar

Enterobacteriaceae ailesinin bazı türler spesifik hastalıklara neden olabilir. İnsan vücudunun birçok bölgesinde doğal flora üyesi olarak kabul edilmemesine karşın barsak florasında normal üyedir. Birçok tür apse, pnömoni, menenjit, yara, septisemi ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. Bazı türler önemli hastane enfeksiyonlarına yol açabilmektedirler (Murray PR, 2008; Jawetz, 2016).

Gastrointestinal sistem enfeksiyonları bu cinse ait türlerde yaygın görülmektedir. Bu aileye ait dört tür primer olarak diyare etkeni (enteropatojenik) vardır. Bu bakteriler *Esherichae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* dır. Bu türlerle beraber bir çok tür de diyare etkeni olarak karşımıza çıkabilir. Üriner sistem enfeksiyonları oluşturan birçok bakteri kolondan üretraya oradan asendan yolla diğer üriner sistem organlarına bulaşarak enfeksiyon etkeni olarak kabul edilebilir. *E. coli*, *Klebsiella* türleri en sık toplumsal kökenli idrar yolu enfeksiyonu (İYE) karşımıza çıkan türler olduğu gibi hastanede yatan hastalarda bu türlere ek *Enterobacter* ve *Serratia* türleri de üriner sistem enfeksiyonları oluşturmaktadır.

Septisemi olgularına genellikle üriner ve gastrointestinal sistem kaynaklı enfeksiyonlar kaynak oluşturmaktadır. Septisemi vakaları immunkompromize hastalar ve primer olarak abdominal veya santral sinir sistemi enfeksiyonu olan vakalarda daha mortal seyretmektedir (Greenwood, 2012; Rodríguez-Baño, 2014; Mandell, 2014).

Enterobacteriaceae türleri alt solunum yolları enfeksiyonlarında da etken olabilirler. Bronşit etkeni olarak tanınan ve toplum, hastane kaynaklı primer lobar pnömoni etkeni olarak *K. pneumoniae* türü alveolar nekrotik destrüksiyon, kavite oluşumu ve kanlı balgam ile karşımıza çıkan enfeksiyonlara neden olmaktadır. *Enterobacteriaceae* türleri çeşitli intraabdominal enfeksiyonlara da neden olmaktadır. Özellikle karaciğer absesi ve safra kanalı enfeksiyonları en sık görülenler arasındadır. Daha az yaygınlıkta ise yara enfeksiyonları ve diğer hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Mandell, 2014).

2.2. Enterobacteriaceae Türlerinin Laboratuvar Tanısı

2.2.1. Kültür

Enterobacteriaceae türlerin doğru bir şekilde üretilmesi, duyarlılıklarının ve direncin tespiti için klinik örneklerin doğru zamanda ve uygun yöntemle alınması, uygun şekilde laboratuvara ulaştırılması çok önemlidir. Bakteriler genel olarak genel kullanım besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Örnekte bakterinin tahmin edilen miktarına göre zenginleştirilen besiyerleri kullanılıp kullanılmayabilir. Özellikle dışkı barsak örnekleri dışındaki örnekler için zenginleştirici besiyerlerinin kullanılması gereksizdir. Dışkı örnekler için Stuart, Carry–Blair, Amies, gliseröllu tamponlanmış tuzlu su gibi besiyerinde taşınması veya saklanması önerilmektedir. Zenginleştirici besiyeri olarak ise sıklıkla selenit F besiyeri kullanılmakta. Klinik örnekler %5 kanlı agar ve EMB agara yapılarak üreyen bakterilerin tanımlanmasına yardımcı olmaktadır. Normal atmosferli etüvlerde, 35–37°C ısıda birçok *Enterobacteriaceae* türü üreme gösterir. Özellikle 1–5°C gibi soğuk ortamlarda üreme gösteren türlerde (*Serratia* ve *Yersinia*) vardır. Koyun (%5) kanlı agarda üretildikleri zaman genellikle hemoliz yapmayan düzgün kenarlı yuvarlak koloniler yapmaktadırlar. Sadece güçlü hemolizin üreten bazı *E. coli* suşları geniş hemoliz yapan koloniler oluşturular. MacConkey agar sıklıkla bu türlerin izolasyonunda kullanılabilen bir diğer besiyeridir. Az bakteri olması düşünülen örneklerde zenginleştirici selenitli besiyerlerinde ön enkübasyon yapılabilir. Bu besiyerlerinin yanında xylose–lysine–deoxycholate (XLD) agar veya hektoen enteric agar kullanılabilir. Sorbitol içeren MacConkey agar *Shiga* toksin üreten O157:H7 *E. coli* izolasyonunu artırmak için kullanılması önerilmektedir (Murray PR, 2008; Kumar 2012; Jawetz 2016).

2.2.2. Türlerin Tanımlanması

Enterobacteriaceae türlerinin kanlı agarda kirli gri S tipi koloniler oluştururken bazı suşların hemoliz zonu da oluşturduğu gözlemlenmiştir. Laktoz negatif olan bu bakteri EMB agarda kırmızı koloniler oluşturur. IMVIC grubu biyokimyasal testleri kullanılarak aileye ait diğer türlerden ayrılabilir. Gelişmiş modern tanısal yöntemlerden olan otomatize sistemler ve Matrix Assisted Laser Desorption ionisation Time of Flight (MALDI TOF) tanı için olumlu sonuçlar

vermekte ve konvansiyonel testler yerlerini tarihin tozlu raflarında almakta (Murray PR; 2008, De Florio, 2018)

Steril vücut sıvılarından veya vücudun steril bölgelerinde enfeksiyon oluşturan etkenin izolasyonu zorluklar çıkarmamaktadır. Lakin kontamine bölgelerden ve çevre örneklerinden bakterinin izolasyonu için özel besiyerleri gerekebilmektedir. Örnek olarak, klinik seyre uyan örneklerden (balgam, trakeal aspirat, akciğer biyopsi örneği, plevral sıvı, dışkı, safra, duodenal aspirat, kan, kateter uçları, orta akım idrar, suprapubik idrar aspiratı, yara) kolaylıkla izole edilebilmektedirler. Alınmış örnekler için en çok kullanılan biyokimyasal testler indol, Ornitin Dekarboksilaz, Voges–Proskauer, o–nitrofenil– β –D–galaktopiranozid, sitrat, üre, hareket testleridir (Murray PR, 2008; Kumar, 2012).

2.3. Enterobacteriaceae Türlerinin Neden Olduğu Enfeksiyonların Tedavisi

2.3.1. Antibiyotiklere Duyarlılık

Enterobacteriaceae 'ların neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde genellikle β -laktam ve β -laktamaz inhibitör kombinasyonları, aminoglikozitler, kinolonlar, kloramfenikol, rifampisin, ve trimetoprim-sülfametoksazol gibi antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır. *Enterobacteriaceae* türleri, ilk antibiyotiklerin kullanıma başladığında pek çok antibiyotiğe duyarlı iken geniş spektrumlu antibiyotiklerin uygunsuz kullanılması dirençli bakteri enfeksiyon sayısında artışa sebep olmuştur. Günümüzde yüksek düzeyde direnç sergileyen suşlar tanımlanmıştır. Kullanıma giren her yeni antibiyotiğe karşı direnç gelişimi ve bu direncin taşınabilir plazmidlerle türler, cinsler ve hatta aileler arasındaki yayılımı söz konusudur. Bazı suşlar ise bazı antibiyotiklere karşı doğal olarak dirençlidirler. Bu suşlarda var olan intrinsek direnç, doğal olarak kromozomalarla kodlanır. Hazırda çeşitli antibiyotiklerin kullanımına bağlı gelişen direncin tespiti zorluklara neden olmaktadır. Dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi zordur. Uygun tedavi ile mortalite oranları azalmakta ve tedaviden önce duyarlılık sonucuna göre uygun tedavi seçeneklerinin gözden geçirilmesi gerekmektedir (Murray PR, 2008; Mandell 2018).

Duyarlılık tespiti için çeşitli yöntemlerin olmasına rağmen genel kullanımda uygulanma kolaylığından dolayı disk difüzyon ve sıvı mikrodilüsyon yaygın kullanılmaktadır. Bakterilerin duyarlılığının ortaya konması aynı zamanda

epidemiyolojik çalışmalara da yol gösterici olmaktadır. Antibiyotiklerin seçici çevre etkisi değiştiğinde salgın yapabilecek suşların direnç paternlerinde de değişiklik olacaktır. Bu değişimler aylar süren salgınlarla belgelendirilmiştir. Epidemik çalışmalar yanısıra duyarlılık çalışmaları bakterileri tanımlama amaçlı olarakta kullanılabilmekte (Potter ve ark., 2016).

2.3.2. Antibiyotiklere Direnç Gelişimi ve Mekanizmaları

Son yıllarda giderek artan antibiyotik direnci *Enterobacteriaceae*' ların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin yoğunlukla tercih edilmesine neden olmuştur. Bu grup antibiyotiklere gelişen direnç ise mortalite ile sonuçlanan enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle karbapenemler önemli antibakteriyel ilaç grubudur. Nozokomiyal *Enterobacteriaceae* izolatlarının direnç mekanizmaları sıklıkla beta laktamaz üretimi, eflüks pompası ve porinlerdeki değişikliklerdir. Ayrıca antibiyotikleri parçalayarak değiştiren enzimler, hedef bölge mutasyonları, ribozomal mutasyonlar veya değişiklikler, bilinen diğer antibiyotik direnç mekanizmalarıdır (Murray PR, 2008; Mandell, 2014).

2.3.3. Aminoglikozid Direnci

Bakterilerde ribozomun 30S ve 50S alt ünitelerine bağlanarak mRNA (mesajcı ribonükleik asit) protein sentezini olumsuz etkileyerek yanlış protein sentezlenmesine sebep olarak bakteri ölümüne neden olmaktadır. *Enterobacteriaceae*' lar aminoglikozidlere karşı çoğunlukla modifiye edici enzimler üreterek direnç geliştirirler. Bunun yanında hedef ribozomal protein değişiklikleri ve hücre içine taşınmada bozukluk ortaya çıkması da diğer direnç mekanizmalarıdır (Murray PR, 2008; Mandell 2014).

2.3.4. Kinolon Direnci

Enterobacteriaceae larkinolonlara karşı sıklıkla DNA giraz (topoizomeraz II) veya topoizomeraz IV'te yapısal değişiklik yaparak direnç geliştirirler. Bu direnç mekanizması genler üzerinde taşınır ve diğer türlere aktarılabilir. İlaç permeabilitesinde ve/veya eflüks pompasındaki değişiklikler de direnç oluşumuna neden olabilmektedir (Mandell 2014).

2.3.5. Polimiksin Direnci

Enterobacteriaceae 'lar kolistine karşı yapısındaki lipopolisakkaritte modifikasyon yaparak ortaya çıkmaktadır. Nadir bir dirençtir (Murray PR, 2008; Mandell, 2014; Munita, 2016).

2.3.6. Beta-Laktam Direnci

Enterobacteriaceae 'ların neden olduğu enfeksiyonlarının tedavisinde oldukça sık kullanılan bu grup antibiyotiklere karşı gelişen dirençte mortalite oranı artmaktadır. Penisilin ve sefalosporin grubu uzun yıllardır kullanımda olduğu için giderek yükselen direnç sözkonusudur. Bu direnç genelde antibiyotiğin hücre içine alınımında azalma, hücre dışına atılma ve mutasyonlar sonucunda bakteri yapısında antibiyotiklere direnç oluşturmaktadır. Bu mekanizmaların dışında *Enterobacteriaceae* 'lar antibiyotiklere karşı geliştirdikleri en sık kullandığı direnç mekanizması bakterinin salgıladığı enzimlerle olmaktadır. Bu enzimlere beta-laktamaz denilmektedir. Betalaktamazların sentezi kromozom, plazmid veya transpozon kontrolündedir (Murray PR, 2008; Mandell, 2014).

Karbapenem sınıfı antibiyotikler yüzlerce çeşit oluşturan beta laktam antibiyotikler arasında kritik önem arz eden bir gruptur. Betalaktam antibiyotiklere karşı artan direnç sebebiyle *Enterobacteriaceae* 'ların neden olduğu enfeksiyonlardakarbapenemler yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bu durum dünyada giderek yaygınlaşan *Enterobacteriaceae* karbapenemaz direncine neden olmuştur. Bu nedenle karbapenemaz üretmeyen karbapenem dirençli izolatlar toplum sağlığı açısından daha az önem arz etmektedir (Nordmann P ve ark., 2012). Özellikle çok ilaca dirençli enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin diğer antibiyotiklerle başarılı kombinasyonları araştırmalarca gösterilmiş, bu kombinasyonların sinerjistik, additif ve olası antagonistik etkileri incelenmiştir (Murray PR, 2008; Mandell, 2014; Munita 2016). İlk karbapenem direnci olarak 1993 yılında *Enterobacteriaceae* ailesine ait *E. cloacae* klinik izolatında kromozomal kodlanan NmcA karbapenemazı tanımlanmıştır (Nordmann P ve ark., 2012). Gram negatif bakterilerde beta-laktamaz enzimlerin sınıflandırmasında en çok Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmaları kullanılmaktadır. Ambler beta-laktamazları moleküler yapılarına göre sınıflandırmıştır (Mandell 2014; Munita 2016).

2.3.7. Ambler sınıflamasına göre Beta laktamazlar

Sınıf A: Penisilinleri hidrolize eden enzimlerdir. Gram negatif basillerde yaygın olarak bulunan, indüklenebilen, klavulonik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlardır. Birçoğu kromozomal bir kısmı ise plazmidlerle kodlanırlar. Bazı karbapenemazlar kromozomal kodlanırken (IMI-1, NMC-A, SME, SHV-38 ve SFC-1) bazıları plazmitle kodlanmakta (KPC, GES, IMI-2). İlk defa 1996 yılında Amerika Birleşik Devletlerinde tanımlanan KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase) A sınıfı arasında en yaygın raslanan karbapenemazdır. Bu karbapenemazı üreten bakteriler sadece birkaç antibiyotiğe duyarlıdır (kolistin, tigesiklin ve bazı aminoglikozitler). Bu karbapenemazlar endemik olarak ABD, Çin, İtalya, Polonya, Yunanistan, İsrail, Brezilya, Arjantin, Kolombiya ve Tayvanda görülmektedir. Sporadik olarak birçok avrupa ülkesinde – İspanya, Fransa, Almanya, İrlanda, Birleşik Krallık, Belçika, İsviçre, Finlanda yanısıra Asya-Pasifik ülkelerinden Güney Kore ve Avustralyada da raslanmaktadır. ABD’de 2007 ve 2009 arasında KPC pozitif izolatların prevalansı relatif olarak sabit olmakla birlikte sırasıyla %5.9 ve %5.7 şeklinde olmuştur. KPC üreten Enterobacteriaceae ilk olarak 2001’de Kuzey Karolina’da bir klinik örnekte bildirilmiştir (Murray PR, 2008; Kumarasamy KK, 2010; Miriagou V, 2010; Nordmann P ve ark., 2012; Tzouveleki LS ve ark., 2012). Yunanistanda ilk defa KPC üreten *Klebsiella pneumoniae* 2007 yılında izole edilmiş ve 2003 yılında nerdeyse hiç görülmeyen KPC üreten izolatların prevalansı %38.3 oranına yükselmiştir. Yunanistan’da genellikle KPC-2 geni taşıyan *K. pneumoniae* izolatları genotip analizi sonucunda görülmüştür. Farklı *K. pneumoniae* klonlarının görülmesine karşın ST11 klonunun prevalent olması en son çalışmalarca bu klonun karbapenemlerle inaktivasyona dirençli olması sebep olarak öngörülmekte (Miriagou V ve ark., 2010; Tzouveleki LS ve ark., 2012).

Sınıf B: Aktif bölgelerinde çinko bulunan metallo-betalaktamazlardır (MBL). Bu grupta aktivasyon için metal iyonuna (çinko) gereksinim duyan metallo-betalaktamazlar yer almaktadır. EDTA veya dipikolinik asit ile inhibe olurken betalaktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar. Bu gruba ait karbapenemazlar en yüksek karbapenemaz aktivitesi sergilemekte olan en önemli karbapenemazlardır. (Murray PR, 2008; Martínez-Martínez, 2014). *Enterobacteriaceae* suşlarında yaygın görülen karbapenemazlardan Verona İntegron Encoded MBL (VIM), İmipenemase

(IMP), New Dehli MBL-1 (NDM-1) dir. VIM pozitif *K. pneumoniae* ilk olarak 2001-2003'te Güney Avrupa'da gözlenmiştir (Cornaglia G ve ark., 2011). *K. pneumoniae*'nin, VIM direnc geni 1990'larda ilk defa Japonya'da ve sonra uzak doğuda bazı bakteri türlerinde saptandı (Queenan AM ve Bush K, 2007; Tzouvelekis LS ve ark., 2012). NDM-1 ilk kez Hindistan'ın başkenti New Delhi'ye gitmiş olan İsveçli bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır (Munoz-Bellido JL ve ark., 1999). Hindistan'da bir hastadan NDM-4 ve NDM-5 enzimine sahip *E. coli* izole edilmiştir. Bu enzimler karbapenemaz aktivitesi yüksek olup karbapenemlere yüksek düzeyde direnç göstermektedir (Poeylaut-Palena ve ark., 2007; Cornaglia G ve ark., 2011). Çeşitli integron birimlerinde yer alan bu tip genler özellikle plazmit ve transpozonlarla ilişkili olduklarından kolaylıkla bakteriler arasında yayılım gösterebilmektedirler. En geniş etki spektrumuna sahip bu grup karbapenemazlar tüm penisilinlere, sefalosporinlere, karbapenemlere hidrolitik etki göstermekle beraber bir monobaktam olan aztreonama etkisizdir (Yigit H ve ark., 2001; Kumarasamy KK ve ark., 2010).

Sınıf C: Aktif bölgelerinde serin bulunan sefalosporinazlardır. AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılırlar. Bu grup penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenesilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre altı gruba ayrılırlar. Bu grupta yer alan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri“geniş spektrumlu” enzimlerdir. Karbapenemlere sınırlı etki gösterirler veya etkisizdirler. Beta-laktam maruziyetine yanıt olarak indüklenebilirler (Rodríguez-Baño J ve ark., 2018).

Sınıf D: Bu grubu oksasilinazlar (OXA) oluşturmaktadır. Bu grup enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulunur. *Enterobacter* ailesinde daha sıklıkla görülen karbapenemaz OXA-48 olarak literatüre geçmiştir. 2001'de karbapenemaz aktivitesine belirgin olan OXA-48, *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır. *K. pneumoniae*'de OXA-48'in nokta mutasyonlar sonucu oluşan diğer karbapenem hidrolize eden OXA-163, OXA-181 ve OXA-181 varyantları vardır (Nordmann P ve ark., 2012; Lund BA ve ark., 2017). Centers of Disease Control (CDC) 2017 yılındaki raporunda karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'lerin toplum sağlığı açısından güncel tehdit oluşturan mikroorganizmalar olarak açıklanmıştır. Multirezistan *Enterobacteriaceae* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan karbapenemlere son on yıl içinde dünya çapında artan direnç paterni dikkat çekmektedir (Nordmann P,

2012). Bu antibiyotiklerin doğru ve uygun kullanımı için dirençli bakterilerin erken tespiti önemlidir. Güvenilir ve erken tespit kaynak izolasyonu ve salgın tespiti için hayati önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan araştırmalarda çeşitli direnç tespit yöntemleri ortaya konmuştur (Pitout JD, 2008).

Tablo 3. *Enterobacteriaceae*'de bazı plazmit kökenli karbapenemazlar

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

Kaynak: Martínez-Martínez (2014); van Duin (2017)

2.4. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Yöntemler

Enterobacteriaceae türlerindeki karbapenemazların tespitinde bazı zorluklar bulunmaktadır. Karbapenemaz üreten bazı suşlarda karbapenemlere direnç saptanamamaktadır. Bazılarında ise sadece karbapenem MİK düzeylerinde az bir artış görülmekte. Bunun yanısıra porin kaybı, GSBL, Amp-C beta laktamaz ve karbapenemaz varlığı gibi nedenlerden dolayı bu dirençlerin sadece antibiyogram yapılarak birbirinden ayırmak zordur. CLSI, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* türleri genellikle, bir veya daha fazla karbapeneme orta derece duyarlılık veya direnç bunun yanında bir veya daha fazla üçüncü kuşak sefalosporine (sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, seftriakson) direnç gösterdiklerinden Modifiye Hodge testi (MHT) ile bu tespiti yaparak saptamayı önermiştir (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2017). Ertapenem direnci karbapenemaz üretiminin en duyarlı göstergesi olduğu ancak özgüllüğünün düşük olduğu belirtilmektedir. Özgüllüğü yüksek bir diğer test olan moleküler yöntemlerin ise her laboratuvar da çalışılması maliyet ve uygulama açısından zordur. Karbapenemaz tespitinin zor olması nedeniyle ucuz, güvenilir basit test arayışları devam etmektedir. Bu nedenle farklı metot ve yöntemler karbapenemaz tespiti için geliştirilmiştir. Çoğu kurumda, karbapenemaz tayini enfeksiyon kontrol amaçları için yapılmaktadır.

2.4.1. Modifiye Hodge Testi

Karbapenemaz üreten bakteriler için geliştirilen bu testin diğer adı yonca yaprağı testidir. Bakterilerin in vitro karbapenemaz üretimini ortaya çıkarmayı amaçlayan fenotipik bir testtir (Clinical and Laboratory Standards Institute). CLSI tarafından *Enterobacteriaceae* 'larda KPC tip karbapenemaz tayininde önerilmiştir. Duyarlılık ve özgüllüğü düşük olmakla birlikte yorumlanması güç olduğu için EUCAST tarafından önerilmemektedir (Giske CG ve ark., 2012). Bu yöntem, karbapenemazların tip tayinini yapmaz ve CTX-M tipi GSBL veya artmış sefalosporinaz nedeniyle yanlış pozitif sonuç verebilmektedir (Nordmann P ve ark., 2012; Giske CG ve ark., 2011; Giske CG ve ark., 2012). Hazırda laboratuvarlarda karbapenemaz tespiti amaçlı tek yöntem olarak kullanılması önerilmemekte, diğer yöntemlere yardımcı olarak önerilmektedir (Giske CG ve ark., 2011).

2.4.2. İnhibitör Bazlı Testler

KPC Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler

In vitro olarak *Enterobacteriaceae* türlerinin KPC üretiminin fenotipik tespitini sağlayan bir testtir. KPC'ler boronik asit ve türevleri ile inhibe olurlar. Bu temele dayalı olarak kombine disk testi ile boronik asit kullanılarak elde edilen sonuçlar yorumlanır (Pasteran FG ve ark., 2008). Aynı agarda sadece meropenem ve PBA+meropenem diskleri kullanılır. Kombine diskinin çevresinde ≥ 5 mm'lik artış olması KPC üretimini var olduğu anlamına gelmektedir. Ancak hem KPC, hem MBL tipi karbapenemaz üreten bakterilerin taininde sorun yaşanmaktadır. EUCAST sık görülen direnç profilleri için Alfa Fenil Boronik Asit (APBA) + Dipikolinik Asit (DPA) kombinasyonunun kullanımını önermiştir. Ancak doğruluğu yeterince test edilemediği belirtilmektedir (Nordmann P ve ark., 2011; Nordmann P ve ark., 2012). Bu test sadece KPC üreten *K. pneumoniae* ile kısıtlıdır. Boronik asit türevlerinin AmpC tipi beta-laktamaz (sefalosporinaz) ında potansiyel inhibitörleri olduğu unutulmamalıdır. DPA yanında eş zamanlı kloksasilin kullanılması da önerilmektedir (Giske CG ve ark., 2011). Ayrıca VIM beta-laktamaz ortak üretimi olan KPC pozitif *K. pneumoniae* suşlarda yine başarısız kalacağı unutulmamalıdır (Giakkoupi P ve ark., 2009).

MBL Tespiti İçin Kullanılan Yöntemler

MBL üreten suşların fenotipik tayininde kullanılan MBL'lerin EDTA ile spesifik inhibisyon temeline dayanan bir testtir. Ayrıca, 2-merkaptopropionik ve merkaptaoasetik asit gibi tiyol bileşiklerinin yanı sıra DPA ve 1,10-fenantrolin gibi diğer şelatör ajanların kullanıldığı çeşitli teknikler de geliştirilmiştir. Duyarlılığın artması için EDTA ile birlikte 2-merkaptopropionik asit kullanımı da önerilmiştir. Şelatörlerle kombinasyon için en yaygın olarak seftazidim (seftazidim/EDTA,2-merkaptopropionik asit) içeren diskler kullanılır. İmipenem ve EDTA içeren stripler de kullanılabilir. Bu testin yorumlaması zor olmakta ve kantitatif sonuç vermez. *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de iyi sonuçlar göstermesine rağmen, diğer *Enterobacteriaceae* türleri için dah fazla çalışmaya ihtiyaç vardır (Osano E ve Miriagou, 2010).

2.4.3. MAST Disk MastID Testi

Test ticari olarak hazır sunulan ve karbapenemazların tanısında kullanılan bir testtir. Kombine disk yöntemine benzer olarak hazırlanmıştır. Birinci disk A'da karbapenem (meropenem, 10 µg) içeren; ikinci disk B de meropenem (10 µg) ve bir

MBL inhibitörü, üçüncü disk C de bir KPC inhibitörü ile meropenem (10 µg) içermektedir. Temosillin diski zop çapı ile OXA aktivitesi incelebilmektedir. Böylece aynı anda bir bakteride MBL, KPC, OXA aktivitesi araştırılma imkanı sunmaktadır (Doyle ve ark., 2012).

2.4.4. Biyokimyasal metotlar – CarbaNP Testi

CarbaNP testi ticari olarak hazırlanan imipenemin in vitro hidrolizine dayanan biyokimyasal bir testir. İmipenem hidrolizi ile ortam pH değişikliğine bağlı olarak kullanılan fenol kırmızısı indikatöründe renk değişimi saptanır (kırmızıdan sarıya/turuncuya). Testin duyarlılığı ve özgüllüğü moleküler tekniklere benzer olarak %100'e yakındır. *Enterobacteriaceae* türlerinin bilinen tüm karbapenemazların yanında yeni ortaya çıkan karbapenemazları da tanıma kapasitesi vardır. Bu hızlı sonuç veren (<2 saat), kolay ve pahalı olmayan teknik dünya çapında her laboratuvarında uygulanabilir. Ayrıca özel ekipman gerektirmez. EUCAST tarafından *Enterobacteriaceae* türlerinin karbapenemaz tespitinde önerilen bir testtir (Giske CG ve ark., 2012).

2.4.5. Karbapenemaz Aktivitesinin Spektrofotometri ile Tayini

Karbapenemaz enzimlerinin Matriksle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/iyonizasyon Uçuş Zamanı Kitle Spektrometresi – MALDI TOF yöntemiye tespiti ve ölçümüne dayanır. Oldukça pahalı cihaz, deneyimli personel gerektirmesi ve uygulanması zor bir yöntem olduğu için kullanımı kısıtlıdır (Lucia De Florio ve ark., 2012).

2.4.6. Kromojenik Besiyerleri

Test ticari olarak hazırlanan besiyeleri ile karbapenemaz üreten bakterilerin tespiti yapılır. Bu tarama yöntemi ile besiyerine direkt örneklerin ekilmesi ve inkübasyon sonrası değerlendirme yapılmaktadır. Dışkı veya rektal sürüntü örnekler için uygun bir yöntemdir. Yüksek düzey karbapenemaz salınımında etkilidirler. Duyarlılığı düşük ve özgüllük yüksektir. İçeriğinde sefpodoksim içeren besiyeri (ChromID ESBL [bioMerieux, Marcy-l'Etoile, Fransa]) ile karbapenem içeren bir besiyeri (CHROMagar KPC) karbapenemaz üreticilerinin taranması için geliştirilmiştir. Her iki besiyeri de *Enterobacteriaceae* türlerinin tanınmasını sağlayan kromojenik moleküller içerir. CHROMagar KPC sadece yüksek düzey karbapenem

direnci gösteren karbapenemaz üreticilerini saptar. Bu nedenle ana dezavantajı duyarlılığının düşük olmasıdır. Son dönemde çinko, kloksasilin ve OXA-48 dahil tüm karbapenemaz üreticilerinin saptanmasında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek olan bir karbapenemaz molekülü içeren bir besiyeri (SUPERcarba) geliştirilmiştir. Bu kültür bazlı testlerin hiçbiri karbapenemazın tipini idantifiye etmeyecektir. Ekim yapıldıktan sonra 48 saat inkubasyona tabi tutulur (Garcia-Quintanilla M ve ark., 2018).

2.5. Karbapenemazların Tanısında Kullanılan Genotipik Yöntemler

Fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükle ilgili sorunları çözmek için karbapenemaz genlerinin tespitine dayanan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) bazlı yöntemler vardır. Tek bir karbapenemaz tipini hedefleyen tekli PZR yöntemleri veya birden çok karbapenemaz gen tespiti için kullanılan multipleks PZR yöntemleri vardır (Tzouvelekis ve ark., 2012). Bu yöntemler için üretilmiş kitler (örneğin Hyplex MBL ID ve Hyplex CarbOxa ID kits [BAG Health Care, Lich, Almanya]) ticari olarak satılmaktadır. Microarray yöntemi aynı anda birçok karbapenemaz genlerini tespit imkanı tanımaktadır (Cuzon G ve ark., 2012). Moleküler yöntemlerde sorun; saptanacak direnç genlerinin önceden tanımlanması gerekliliğidir.

3. MATERYAL ve METOT

3.1. Bakterilerin Eldesi ve Tanımlanması

Çalışmamıza Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına 1.01.2016- 30.09.2016 tarihlerinde gelen hasta örneklerinden izole edilen toplam 120 *Enterobacteriaceae* suşu alındı. Bu suşlar her hangi bir karbapenem sınıfı antibiyotiğe direnci moleküler (multipleks PZR) olarak kanıtlanmış suşlardı. Suşların PZR sonuçları Tablo 4 de verilmiştir

Tablo 4. Kullanılan suşların multipleks PZR sonuçları

PZR	Suş sayısı (%)
Negatif	40 (36,6)
Pozitif	70 (63,4)
Toplam	110 (100)

Çalışmada incelenen suşların örneklerin servis dağılımı tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 5. Kullanılan suşların izole edildiği servis/poliklinikler

No	Servis/Poliklinik ismi	Suş sayısı (%)
1	Çocuk hastanesi	15 (13,6)
2	İç hastalıkları ve Yoğun bakım	44 (40)
3	Cerrahi birimler	16 (14,5)
4	Enfeksiyon hastalıkları	4 (3,7)
5	Acil ve ilkyardım	6 (5,5)
6	Nöroloji	13 (11,8)
7	Diğer	12 (10,9)
Toplam	110	110

Çalışmada kullanılan suşlar koleksiyon suşları olup daha önceden duyarlılık ve PZR gen analizi yapılmıştır. Suşlar saklama besiyerinden çözünerek tekrar canlandırıldı. Önceden hazırlanmış %5 koyun kanlı agara ve Eozin Metilen Blue (EMB) agara (Orbak, Türkiye) ekilerek 24 saat +37 °C enkübe edildi.

Tablo 6. Kullanılan suşların türlerinin ve PZR sonuçlarının dağılımı

No	Bakteri türü	Suş sayısı (%)	PZR sonuçları	
			Pozitif	Negatif
1	<i>E. coli</i>	15 (13,6)	6	10
2	<i>Klebsiella spp.</i>	91 (92,7)		
	<i>K. pneumoniae</i>	87	60	26
	<i>K. oxytoca</i>	4	3	1
3	<i>Proterus spp.</i>	3 (2,7)	0	3
	<i>Proteus mirabilis</i>	2	0	2
	<i>Proteus vulgaris</i>	1	0	1
4	<i>Enterobacter aerogenes</i>	1(1)	1	0
Toplam		110	70	40

3.1.1. Modifiye Hodge Testi

Bir gece enkübe edilmiş *E. coli* ATCC 25922 taze kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığında suspansiyon hazırlandı. Bu suspansiyon 1/10 oranında serum fizyolojikle sulandırılarak steril eküvyonla MHA besiyerine eşit şekilde inoküle edildi. Petrinin tam ortasına gelecek şekilde Meropenem (10 µg) diski yerleştirilerek test izolatlarının her birinden steril özeyle petrinin kenarından merkeze doğru ekim yapıldı. Ekim keşişme noktası değerlendirilerek sonuçlar kaydedildi.

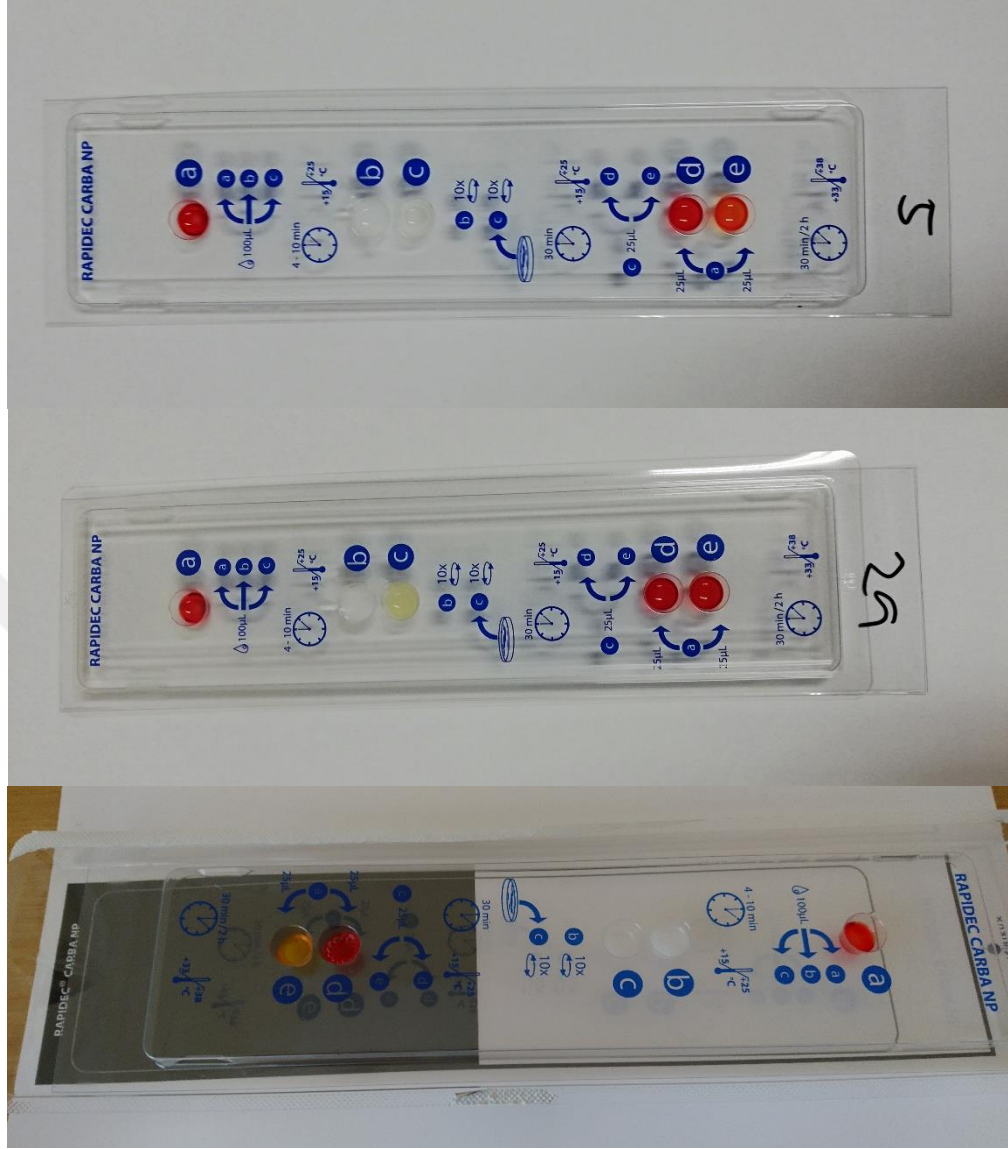


Şekil 1. Modifiye Hodge Testi

3.1.2. CarbaNP Testi

Bu test aşağıda belirtildiği gibi üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı.

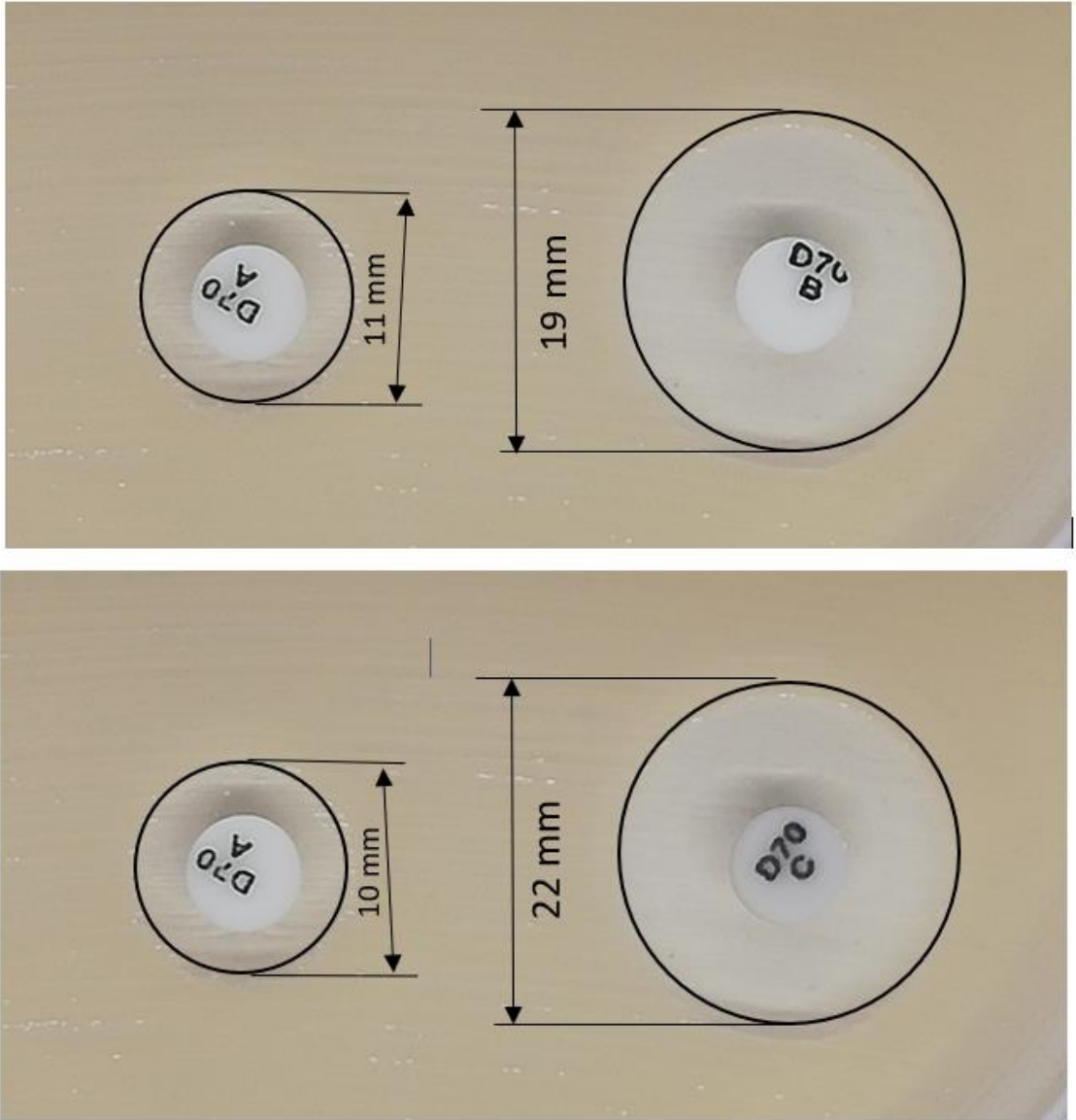
1. Bir gece inkübe edilmiş taze bakteri kültürü kullanıldı
2. Çalışılacak test stripleri önceden oda ısına gelecek şekilde bekletildi
3. Stripler ambalajından çıkarılarak suş numaraları yazıldı
4. Her stripde olan A, B ve C kuyucuğuna testle birlikte sunulan solüsyondan 100 ml konarak sonrasında plastik çubukla B kuyucuğu karıştırıldı
5. C kuyucuğuna bakteri kolonileri plastik çubukcuklarla konarak B kuyucuğundaki yoğunluk eşdeğeri elde edildi.
6. 30 dakika oda ısısında inkübe edilerek sonrasında C kuyucuğundan D ve E kuyucuğuna 25 µL eklendi
7. Sonradan A kuyucuğundan 25 µL D ve E kuyucuğuna eklendi
8. Stripler 37 °C etüvde inkübe edildi ve sonuçlar 30 ve 120 dakika sonra değerlendirildi.
9. Sonuçlar kaydedildi.



Şekil 2. RAPİDEC CarbaNP testi

3.1.3. MAST ID Mast Disk Testi

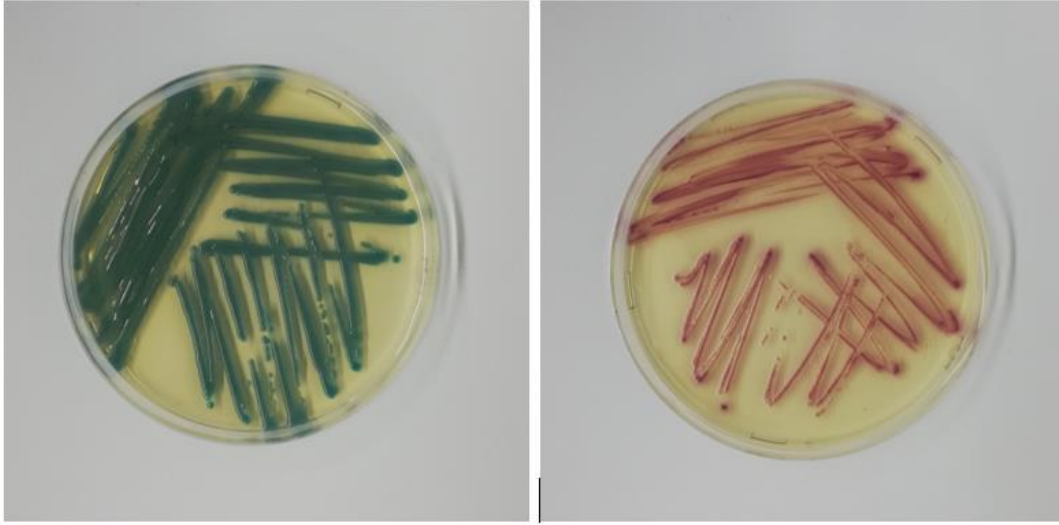
Bu test üretici firma önerileri doğrultusunda çalışıldı. Bir gece inkübe edilmiş taze bakteri kültüründen 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlandı. Steril eküvyonla MHA (HiMedia, Hindistan) besiyerine süspansiyondan eşit şekilde inoküle edildi. Steril penset kullanarak Mast diskleri besiyeri üzerine yerleştirilerek +37 °C normal atmosferli etüvde 16-20 saat inkübe edildi. İnhibisyon zonları kaydedilerek sonuçlar değerlendirildi. A ve B diski, A ve C diski zon çapları karıştırılarak aradaki farkın A ve B için 5 mm ve üzeri olması, A ve C içinse 4 mm ve üzeri olması uygun olarak KPC ve MBL olarak kabul edildi.



Şekil 3.MAST disk testi

3.1.4. Kromojenik Besiyerleri

Kromojenik besiyeri toz maddesi (HiChrome KPC Agar Base - HiMedia, Hindistan) hazır şekilde ticari olarak alındı. Toz madde distile suda çözünerek otoklavda steril edildi ve sonrasında 55 °C kadar soğuduktan sonra üzerine suplement eklenerek 90 mm lik steril petrilere dağıtıldı. Tam soğuduktan ve sertleştikten sonra petrilere kullanım zamanına kadar 4 °C muhafaza edildi. Saf bakteri kolonilerinden kromojenik agara tek kullanımlık özellerle inokule edilerek 37 °C etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra bakterinin spesifik renk oluşturma özelliği incelendi ve sonuçlar kaydedildi.



Şekil 4. HiChrome KPC kromojenik besiyeri testi – sağda KPC pozitif, solda KPC negatif suş

3.2 Kalite Kontrol

Çalışmada kalite kontrol amaçlı *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı.

3.3. Gereçler

Çalışma için Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim dalı envanteri kullanıldı. İncelenecek bakteri izolatları Bakterioloji laboratuvarında düzey II biyogüvenlik kabini (Jouan MSC 9-NF-X44-201, Fransa) kullanılarak inoküle edildi. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması için MALDI-TOF (VİTEK MS, BioMerieux, Fransa) cihazı kullanıldı. İzole edilen suşlar daha sonraki kullanıma kadar -80° C saklama dolaplarında (Panasonic MDF-U5386S-PE, Japonya) muhafaza edildi. Çalışma için kullanılan besiyerleri laboratuvarın hazırlık odasında taze olarak hazırlandı. FıratMED (Türkiye) üretimi 90 mm steril petripler kullanıldı. Ticari olarak alınan Kanlı Agar baz maddesi (HiMedia Blood Agar Base, Hindistan), MHA (HiMedia, Hindistan) toz maddesi ve HiChrome KPC AGAR (HiMedia, Hindistan) toz maddesi ile birlikte koyun kanı kullanıldı. Koyun kanı Pendik EA dan temin edildi. Analitik tartı (Axis, Türkiye) ile tartılarak toz maddeye distile su eklendi. Hazırlık odasının tam otomatik otoklavı (HIRAYAMA HMC, Japonya) kullanıldı. Besiyerlerine eklenecek ısıya duyarlı ürünlerin eklenmesi için benmari (Nüve ST-402, Türkiye) kullanıldı. Hazırlanmış besiyerleri kullanım zamanına kadar +4° C ortamda (Arçelik No-Frost, Türkiye) muhafaza edildi. Tekrar kullanılacak izolatlar steril tek kullanımlık öze

(Kalıp San LTD ŞTİ) kullanılarak önceden hazırlanmış Koyun Kanlı Agar ve ticaretten hazır temin edilmiş EMB agara (Orbak, Türkiye) inokule edildi. Çalışmada 72 saatlik üremeni geçmemiş taze koloniler kullanıldı. Biyogüvenlik düzey II kabini (Jouan MSC 9-NF-X44-201, Fransa) içinde çalışma sürdürüldü. Saf üreme olan kolonilerden plastik çubuklu steril eküvyon yardımıyla cam tüplerde steril edilmiş SF (Neofleks %0.9 NaCl 250 ml) li süspansiyonları hazırlanarak dansitometri cihazında (BioSan DEN-1B) 0.5 türbidite ayarlanma için kullanıldı. Pipetleme için otomatik pipet (Boeco, Almanya) ve steril edilmiş pipet uçları kullanıldı. İnkübasyon için normal atmosferli etüv (Mipro, Türkiye) kullanıldı. Modifiye Hodge Testi için Meropenem diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanıldı.



Şekil 5. -80 °C saklama dolabı



Şekil 6. Benmari



Şekil 7. Otomatik pipet



Şekil 8. Etüv



Şekil 9. Otoklav



Şekil 10. MALDİ TOF VITEK MS

3.4. Besiyerleri

Çalışmada koyun kanlı agar, Eosin Methylen Blue agar, Mueller Hinton Agar ve kromojenik agar toz maddesi kullanıldı. Kanlı agar toz maddesi distille suda çözünerek otoklavda steril edildikten sonra +55 °C sıcaklığa ulaşana kadar benmaride bekletildi ve koyun kanı eklendi. Agar 90 mm steril petrilere dağıtılarak +4° C ortama alındı. EMB agar ticaretten hazır temin edildi. MHT agar toz maddesi distille suda çözüldükten sonra otoklavda steril edilerek +55 °C ısıya geldikten sonra 90 mm steril petrilere dağıtılarak soğuduktan sonra +4 °C ortamda muhafazaya alındı.

Çalışmada kromojenik besiyeri olarak HiMedia üretimi (HiChrome KPC Agar Base - HiMedia, Hindistan) besiyeri toz maddesi ve supplementi kullanıldı. Toz madde distile suyla çözünerek +121 °C 15 PSI basınçla otomatik otoklavda steril edilerek sonradan benmaride +55°C gelmesi beklendi ve HiChrome KPC supplementi eklenerek 90 mm steril petrilere dağıtıldı. Kuruması beklenerek petrilere bir sonraki kullanıma kadar +4 °C kaldırıldı. Saf üreme olan 72 saatden taze kültürler steril tek kullanımlık özeler kullanılarak besiyerine inoküle edilerek normal atmosferli etüvde +37 °C inkübe edildi. 24 saat inkübasyondan sonra üremiş kolonilerin renk değişimi değerlendirilerek koyu mavi-turkuaz koloniler KPC pozitif, kırmızı-mor renkli koloniler negatif kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen 110 suşun 78'inde (%70,9) Modifiye Hodge testi pozitif, 32'si (%29,1) negatif bulunmuştur. PZR testi sonuçlarına göre Modifiye Hodge testi sonuçlarının karşılaştırması ve türlere göre dağılımı tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Modifiye Hodge test sonuçları

	MHT	n(%)	<i>E. coli</i>	<i>Klepsiella spp.</i>	<i>Proterus spp.</i>	<i>Enterobacte spp</i>
PZR Pozitif	Pozitif	58(82,9)	7	50	0	1
n:70	Negatif	12(17,1)	2	10	0	0
PZRNegatif	Pozitif	20(50)	3	16	1	0
n:40	Negatif	20(50)	3	15	2	
	Toplam	110	15	91	3	1

MHT: Modifiye Hodge Test; **n:** Suş sayısı

Çalışmaya dahil edilen 110 suşta CarbaNP testiyle 82 (%74,5)'si pozitif, 28 (%25,5) suş negatif bulunmuştur. PZR testi sonuçlarına göre CarbaNP testi sonuçlarının karşılaştırması ve türlere göre dağılımı tablo 8'de verilmiştir.

Tablo 8. RAPİDEC CarbaNP test sonuçları

	CarbaNP	n(%)	<i>E. coli</i>	<i>Klepsiella spp.</i>	<i>Proterus spp.</i>	<i>Enterobacter spp</i>
PZR Pozitif	Pozitif	64(91,4)	8	55	0	1
n:70	Negatif	6(8,6)	1	5	0	0
PZR Negatif	Pozitif	7	1	6	0	0
n:40	Negatif	33	5	25	3	0
	Toplam	110	15	91	3	1

CarbaNP: RAPİDEC CarbaNP testi, **n:** Suş sayısı

Çalışmaya dahil edilen 110 suшта kromojenik besiyeri kullanılarak yapılan test sonucuna göre 73 (%66,4) suş pozitif, 37 (%33,6) suş negatif bulunmuştur. PZR testi sonuçlarına göre kromojenik besiyeri testi sonuçlarının karşılaştırması ve türlere göre dağılımı tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 9. HiChrome KPC kromojenik besiyeri test sonuçları

	HiChrome Agar	n(%)	<i>E. coli</i>	<i>Klepsiella spp.</i>	<i>Proterus spp.</i>	<i>Enterobacter spp</i>
PZR Pozitif	Pozitif	58	6	51	0	1
n:70	Negatif	12	3	9	0	0
PZR Negatif	Pozitif	15	2	13	0	0
n:40	Negatif	25	4	18	3	-
	Toplam	110	15	91	3	1

n: Suş sayısı

Çalışmaya dahil edilen 110 suшта MAST disk test sonucuna göre 74(%67,3) suş pozitif, 13(%32,7) suş negatif bulunmuştur. PZR pozitif suşların 67(%95,7)’sinde

MAST disk testinde pozitif saptandı. Bu teste göre çalışmaya dahil ettiğimiz suşlarda en fazla OXA-48 (%87,1) karbapenemaz türü saptandı. PZR negatif suşlardan PZR testi sonuçlarına göre MAST disk testi sonuçlarının karşılaştırması ve tespit edilen enzim türüne göre dağılımı tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. MAST disk testi ile tespit edilen karbapenemaz türlerinin dağılımı

	Karbapenemaz türü	n(%)	<i>E. coli</i>	<i>Klepsiella spp.</i>	<i>Proterus spp.</i>	<i>Enterobacter spp</i>
PZR	MBL	28	3	25	-	-
Pozitif	KPC	9	1	8	-	-
n:70	OXA-48	61	7	53	-	1
	KPC+MBL	8	1	7	-	-
	KPC+OXA	7	1	6	-	-
	MBL+OXA	24	2	22	-	-
	MBL+OXA+KPC	6	1	5	-	-
PZRNegatif	MBL	3	1	2	-	-
n:40	KPC	2	1	2	-	-
	OXA-48	2	1	1	-	-
	KPC+MBL	2	-	2	-	-
	MBL+OXA	1	-	1	-	-
	OXA+KPC	-	-	-	-	-

n: Suş sayısı

Çalışmamızda kullandığımız dört farklı metodu birbiriyle karşılaştırdığımızda sırası ile sensitivite ile spesifitesleri ve PPD ile NPD'leri en yüksek olan testler

CarbaNP ile MAST disk olmuştur. Diğer testlerin ayrıntılı ve karşılaştırmalı dağılımları Tablo 11’de verildi.

Tablo 11. Çalışılan yöntemlerin karşılaştırmalı sonuçları

Testler	Sensitivite (%)	Spesivite (%)	PPD(%)	NPD(%)
MHT	90	75	80,7	78,1
CarbaNP	91,4	82,5	90,1	84,6
Kromojenik BY	89,7	62,5	79,5	67,6
MAST disk	95,7	82,5	90,5	91,6

MHT: Modifiye Hodge testi; **PPD:** Pozitif prediktif değer; **NPD:** Negatif prediktif değer.

Mast Disk sonuçlarına göre, çalışmada enfeksiyon hastalıkları kliniği çocuk hastanesinden gelen örneklerde üreyen suşlarda KPC karbapenemaz saptanmamıştır. Diğer servislerde sırasıyla OXA-48, MBL ve KPC karbapenemaz saptanmıştır. Karbapenemazların dağılımı tablo 12’de verildi.

Tablo 12. Çalışılan suşların servis/poliklinik dağılımı ve Mast Disk test direnç geni bulguları

No	Servis/Poliklinik ismi	Suş sayısı (%)	MBL	KPC	OXA
1	Çocuk hastanesi	15 (13,6)	4	-	9
2	İç hastalıkları ve Yoğun bakım	44 (40)	14	4	26
3	Cerrahi birimler	16 (14,5)	2	1	6
4	Enfeksiyon hastalıkları	4 (3,7)	1	-	2
5	Acil ve ilkyardım	6 (5,5)	4	3	4
6	Nöroloji	13 (11,8)	2	1	8
7	Diğer	12 (10,9)	2	1	6
Toplam		110			

5. TARTIŞMA

Enfeksiyon hastalıkları ve Klinik mikrobiyolojinin son yıllardaki en büyük problemi mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri dirençtir. Bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirmiş oldukları direnç mekanizmalarının araştırılması ve bunlara karşı çözüm üretilmesi mikrobiyoloji laboratuvarlarının önemli bir uğraşısı haline gelmiştir. Bu laboratuvarlar geçmiş yıllarda tanıda etkenlerin ortaya konması ve tanımlanmasıyla uğraşırken artık bu ihtiyacın yanında tanımlama yapılan mikroorganizmaların tür düzeyinde, yakın ilişkide bulunduğu mikroorganizmaların yanında dirençli oldukları antibiyotikler ve bu direnç mekanizmalarının yanında bu direncin ortaya konmasında önemli rol oynamaktadırlar. Gram negatif bakteriler hem toplumda hemde hastanede yatan hastalarda neden oldukları enfeksiyon bakımından önemli bir grup bakteridir (Güran M ve ark., 2016).

Enterobacteriaceae ailesinin bazı türleri spesifik hastalıklara neden olabilir. İnsan vücudunun birçok bölgesinde normal flora olarak kabul edilmemesine karşın normal barsak florasında normal üyedir. Birçoğu apse, pnömoni, menenjit, yara, sepsis ve üriner sistem enfeksiyonlarına neden olmaktadır. (Murray PR, 2008; Jawetz 2016). Gastrointestinal sistem enfeksiyonları bu cinse ait türlerde yaygın görülmektedir. Sepsis vakaları immünkompromize hastalar ve primer olarak abdominal veya santral sinir sistemi enfeksiyonu olan vakalarda daha mortal seyretmektedir (Rodríguez-Baño ve ark., 2012; Mandell, 2014).

Gram negatif bakterileri grubu içinde en büyük aile *Enterobacteriaceae* ailesidir. Çevremizde oldukça yaygın olarak bulunabilen bu bakteri türlerinin neden oldukları enfeksiyonların tedavisi günümüzde antibiyotiklere karşı giderek artan direnç söz konusudur. Bu direncin türler arasında da yayılmasından sonra son zamanlarda neredeyse kullanımda olan antibiyotiklere dirençli hale gelmişlerdir. Bu durum insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Karbapenemlerin *Enterobacteriaceae* türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan en etkili ilaç grubudur. Ancak bakterilerde antibiyotiklere karşı kazandıkları direnç nedeniyle *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem grubu (imipenem, meropenem, ertapenem) antibiyotiklerin yoğun olarak tercih edilmesine neden olmuştur. Bu antibiyotiklere karşı gelişen direnç ise ciddi sorun oluşturmakta ve tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlamıştır (Murray PR, 2008).

Enterobacteriaceae spp. suşlarında karbapenem direnci çoğunlukla karbapenamaz özelliği olan beta-laktamaz üretimi ile gelişmektedir. Karbapenamazlar, karbapenemlerin hidrolizine ve bunun sonucunda karbapenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde yükselmeye neden olan betalaktamazlardır. Karbapenem direncinde, karbapenamazlara göre daha kısıtlı olan diğer mekanizmalar, efluks, impermeabilite ve buna eşlik eden AmpC veya GSBL üretimidir. Karbapenem direncinin başlıca sorumlusu olan karbapenamazların tespiti rutin laboratuvar çalışmalarda önemini koruyarak zorluklara neden olmaktadır (Güran M ve ark., 2016).

Karbapenamaz varlığı klinik laboratuvarlarda yapılan bir dizi yöntemlerle tespit edilebilir. Bunlar otomatize sistemler veya disk difüzyon, MİK, selektif besiyerleri, Karbapenamaz İnaktivasyon Testi (KİT), MHT, sinerji testleri, spektrometri, gen dizilimi tespiti ve moleküler yöntemlerdir. Karbapenamaz üretimini kontrol eden genlerin çoğunluğu plazmidler tarafından aktarılır. Günümüzde bu enzimlerin tespiti farklı mekanizmaların oluşu ve birçok klinik laboratuvarlarda altın standart kabul edilen moleküler yöntemlerin kullanılamaması nedeniyle zordur. Öte yandan klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi geniş spektrumlu beta-laktamaz inhibitörlerinin karbapenemler ile kombine kullanımı bakteriyel izolatlarda karbapenamaz üretiminin fenotipik tespiti için yeterince güvenilir değildir. Karbapenamaz enzim üretiminin saptanmasında ilk basamak testleri disk difüzyon veya otomatize sistemlerdir. Bu duyarlılık testlerinden önce bakteriyel patojenler için iki gün süren bakteriyel tür tanımlaması gerekmektedir ve yüksek derecede doğru olmasına rağmen, kazanılmış ve intrinsek direnç ayırımında doğal problemler vardır (Güran Mve ark., 2016).

Karbapenamazların fenotipik yöntemler ile saptanması da moleküler yöntemler kadar zorluklarla ilişkili olup bu enzimin tipine, karbapenamaz enzimi bulunan bakteri türüne, enzimi kodlayan genin ekspresyon düzeyine, karbapenamazlar dışında bakteri hücre duvarı geçirgenlik azalması ve/veya atım pompası (efluks pompası) ve/veya AmpC ve GSBL'ler gibi diğer direnç mekanizmalarının varlığına bağlı olarak değiştiğinden oldukça zordur. Moleküler yöntemlerle kıyaslanınca ucuz olması, deneyimli personel gerektirmemesi ve uygulanabilir olması temel avantajlarıdır (Nordman ve ark., 2012).

Enterobacteriaceae toplumunda özellikle hastanede yatan hastalarda en sık enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan gram negatif bakteri türüdür. Doğru tedavi

hastaların hastanede yatış sürelerini kısaltacak, mortalite ve morbititseni azaltacaktır. Çeşitli nedenlerle giderek artan dirençli suşlar nedeniyle bu bakterilerin etken oldukları enfeksiyonların tedavi seçenekleri kısıtlanmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin çok önemli bir yeri vardır. Karbapenem dirençli suşlar için ise çok kısıtlı seçeneklerle tedaviler denenmektedir (Eisenstein BI ve ark., 2014). *Enterobacteriaceae* ürettikleri karbapenemaz enzimleri ile karbapenemlere karşı direnç geliştirmektedirler. Bu direncin doğru, hızlı ve kolay bir şekilde ortaya konması klinisyenin doğru tedaviyi erken zaman içinde tercih etmesine yardımcı olacaktır (Saito ve ark., 2015). Bu konuda çeşitli çalışmalar yapılmış, daha duyarlı, hızlı ve özgül farklı ticari kitler geliştirilmeye çalışılmıştır. Bu testlerin farklı olması her laboratuvar için kendi imaknaları doğrultusunda birini seçme imkanı tanımıştır. Ama literatürdeki farklı sonuçlar kafa karışıklığında neden olmaktadır. Çalışmamızda *Enterobacteriaceae* türlerinin karbapenemaz direncinin tespitinde kullanılan dört farklı test karşılaştırılmış ve laboratuvarımız için en uygun test araştırılma imkanı olmuştur. Aynı zamanda bu çalışma bölgemizde bu konuda yapılan en kapsamlı çalışmadır. Ayrıca bölgenin ön büyük hastanesinde hizmet veren ve karbapenemaz üretimi tespit edilen suşların salgıladıkları karbapenemaz türünü fenotipik yöntemlerle tespit eden bir çalışmadır.

Çalışmamızda kullanılan *Enterobacteriaceae* türlerinde en sık karbapenemaz türü sırası ile OXA-48, MBL, KPC olarak tespit edilmiştir. Ülkemizden yapılan çalışmalarda en sık OXA-48 karbapenemaz türünün tespit edilmiştir (Çakar A ve ark., 2016). Yakın komşu ülkelerde ise OXA-48 ve KPC tespit edilmiştir. Çalışmamızda tespit etmiş olduğumuz karbapenemaz türleri ülkemizde *Enterobacteriaceae* türlerinde en sık görülen karbapenemazlardır (Çakar A ve ark., 2016; Bayramoğlu G ve ark., 2016). Ülkemizi ve dünyada birçok ülkeyi de içine alan çalışmalarda bölgelere göre bu karbapenemaz türünün değiştiği görülmektedir. Tablo 13'te 2014-2015 yıllarını kapsayan epidemiyolojik görünüm verilmiştir.

Tablo 13.Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* Avrupa ülkelerinde karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durum: 2014-2015

Ülkeler	KPC	OXA-48	VIM	NDM	IMP
	2	3	1	2	
Almanya	1	0	0	0	1
Arnavutluk	2	1	2	1	0
Avusturya	4	4	3	3	0
Belçika	4	2	2	2	0
Birleşik Krallık	0	0	0	0	0
Bosna-Hersek	2	1	1	2	0
Bulgaristan	2	1	2	1	0
Çek Cumhuriyeti	1	1	0	4	0
Danimarka	0	1	0	1	0
Estonya	2	1	1	1	0
Finlandiya	2	4	2	3	1
Fransa	2	3	2	2	1
Hırvatistan	2	2	2	1	1
Hollanda	3	3	1	2	1
İrlanda	3	4	4	2	1
İspanya	4	2	1	2	1
İsrail İsveç	1	2	1	1	0
İtalya	5	3	4	1	1
İzlanda	0	0	0	0	0
Karadağ	0	0	0	1	0
Kıbrıs	1	1	0	0	0
Kosova	0	0	0	0	0
Letonya	0	0	1	0	0
Litvanya	0	1	0	1	0
Macaristan	1	2	4	1	0
Makedonya	1	0	0	0	0
Norveç	1	1	1	1	Bilinmiyor 1
Polonya	3	1	2	4	Bilinmiyor 0
Portekiz	2	1	1	2	Bilinmiyor
Romanya	4	4	2	4	0
Sırbistan	1	2	0	2	0
Slovakya Slovenya	4	0	1	1	0
Türkiye	1	2	1	2	1
Yunanistan	0	5	2	3	0
	5	1	5	3	

Bu tablodan anlaşılacağı üzere farklı bölgelerde farklı karbapenemaz sıklığı tespit edilmiştir. Ülkemizde bu karbapenemazlar türlerinin de izolasyonu söz konusudur. Ancak ülkemizde içinde bulunduğu coğrafya ve komşu ülkelerde OXA-48

ve KPC karbapenemaz türlerinin daha sıklıkla görüldüğü bakteri türleri saptanmıştır (Albiger B ve ark., 2015, Güran M ve ark., 2016)

MAST disk testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilgili yapılan çalışmalara baktığımızda Van Dijk ve ark. (2013) çalışmalarında *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemazların tespitinde için %90'nın üzerinde spesifite, %95'in üzerinde, sensitivite bulduklarını raporlamışlardır. Saito ve ark. (2015) çalışmalarında yaptıkları çalışmada ise *Enterobacteriaceae* türünde MAST disk testi için spesifite %100, sensitivite %91 olarak raporlamışlardır. Sakanashi ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* tür bakterilerde MAST disk testi için kullanılan suşların türüne bağlı olarak değişmekle birlikte %28'in üzerinde spesifite raporlamışlardır. Karatuna ve ark. çalışmalarında MAST disk ve Rosco kitlerini karşılaştırarak 12 OXA-48, 16 NDM-1, 11 OXA-48 ve NDM-1, iki KPC ve bir OXA-48 ve VİM eksprese eden 11 *E. coli* ve 34 *K. pneumoniae* izolatını incelemiştir. Sonuç olarak tek karbapenemaz eksprese eden izolatlarda MAST disk testi %78,8, Rosco kiti ise %84,8 sonucu yakalamıştır. İki farklı karbapenemaz üreten suşlardan sırasıyla MAST disk testi ve Rosco kiti %75 ve %100 MBL pozitif şeklinde sonuç vermiştir. Yazarlar kombine direnç paterlerinin testlerin tespit gücünü olumsuz etkileyeceğini, lakin rutin laboratuvarında kullanımda fikir oluşturma bileceğine işaret etmişler. Sabtcheva ve ark. da çalışmalarında MAST disk ve KPC&MBL&OXA-48 disk kitini moleküler metotlarla karşılaştırmıştır. MAST disk testiyle Temosillin diski birlikte KPC&MBL&OXA-48 disk kitinin sonuçlarını güvenilir bulmuşlardır. Çalışmalarında VİM karbapenemazların tespitinde yöntemleri yetersiz bulmuş, diöer metorların değerlendirilebileceğine işaret etmişler. 58 izolatın incelendiği çalışmada 17 KPC pozitif *K. pneumoniae*, üç OXA-48pozitif *K. pneumoniae*, 11 NDM pozitif (4 *Escherichia coli* ve yedi *K. pneumoniae*), vedokuz VİM -pozitif suş (altı *Proteus mirabilis*, iki *Serratia marcescens*, vebir *K. pneumoniae*).Bütün bunara ek olarak 18 negatif kontrol çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışmamızda ise MAST disk testinin duyarlılığı için %96,4, özgüllüğü %77,5 olarak saptandı. Çalışmalara bakıldığında alınan bu farklı sonuçların nedeni suşlara göre ve enzim türlerine göre değişmektedir.

Carba NP testini değerlendiren bazı çalışmalar incelendiğinde Cunningham ve ark (2017) *Enterobacteriaceae* türü bakteriler için %93 spesifite, %90 sensitivite raporlamışlardır. Cunningham SA ve ark (2017) yaptıkları çalışmada

Enterobacteriaceae tür bakterin Carba NP testi için spesifite %100, sensitivite %77,7 olarak raporlamışlardır (2017). Çalışmamızda Carba NP testinin duyarlılığı (%91,4), özgülüğü (%82,5) literatürle uyumlu saptandı. Serap ve ark çalışmalarında Carba NP testi ve Karbapenemaz İnaktivasyon Testini (KİT) karşılaştırarak toplam 83 direnç geni kanıtlanmış suşu ve 30 negatif kontrol suşu incelemişler (Serp ve ark. 2017). Çalışmada 74 OXA- 48 ve 9 OXA- 48 ve NDM geni eksprese eden suş her iki testle pozitif olarak saptanmıştır. CarbaNP testiyle sadece OXA-48 geni olan dokuz izolat negatif bulunmuştur. İki izolat KİT ile yanlış negatif olarak tespit edilmiştir. CarbaNP ve KİT testi sensitivite %89,16, %97,59 şeklinde olup her iki test için sensitivite %100 olarak görülmüştür.

HiChrome KPC kromojenik besiyeri kullanılarak *Enterobacteriaceae*'da karbapenemaz varlığının taranması ile ilgili çalışmalara baktığımızda Simner ve ark ChromID Carba besiyeri ile yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* türlerinde ortalama %75 sensitivite, % 85'in üzerinde olduğunu spesivite raporlamışlardır (Simner, 2016). Zarakolu ve ark. yaptıkları çalışmada ChromID carba sensitivite %57,6, spesivite %98,9, olarak raporlamışlar (Zarakolu ve ark, 2015). Çalışmamızda HiChrome KPC kromojenik besiyeri testinin duyarlılığının literatürle uyumlu (%89,7), özgülüğünü ise literatüre göre düşük (%62,5) olarak saptadık.

MHT testi ile ilgili bazı çalışmalar incelendiğinde, Dijk ve ark yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz varlığını araştırmada %59 spesifite, %99 sensitivite raporlamışlar (Dijk ve ark., 2013). Saito ve ark (2015) ise bu grup bakterilerde aynı test için %87 sensitivite, %100 spesivite tespit etmişlerdir. Çalışmamızda ise *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz varlığı için kullandığımız MHT testi ile %90 duyarlılık, %75 özgülük saptadık. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuç literatür sonuçları ile karşılaştırdığımızda MHT testinin performansının iyi olduğunu düşündürmüştür.

Çalışmamızda ise *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz varlığının araştırmada kullandığımız MAST diske ait PPD'inin (%90,5), Carba NAP testiyle benzer; diğer testlerden yüksek saptanması her iki testin performansının birbirine yakın olduğunu düşündürmüştür. *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz varlığının araştırmada kullandığımız MHT testinin PPD ve NPD, HiChrome KPC kromojenik

besiyeri için elde edilen sonuçlardan yüksek olması bu testin önemini yitirmediği göstermektedir.

Sonuç olarak çalışmamızda suşlarımızda OXA-48 karbapenemaz türünün yüksek olduğunu, karbapenemaz tespiti için kullandığımız dört farklı testten MAST disk ve Carba NP test sonuçlarının birbirine yakın olduğunu, testler arası farklılığın giderek artan ve sadece bir testle tespit edilemeyen farklı karbapenemaz varlığının olduğunu düşündürmüştür. Yinede MAST disk veya Carba NP testinin herhangi birinin labortauvarca kendi imkanlarınca tespiti, karbapenemaz türünün tespiti için ise MAST disk yönteminin tercihinin daha uygun olacağı kanaatine varılmıştır.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. 110 suştan 78 (%70,9)'inde Modifiye Hodge testi pozitif, 32 (%29,1)'i negatif bulunmuştur.

2. Modifiye Hodge testinin duyarlılığı %90, özgüllüğü %75, PPD %80,7, NPD %78,1 olarak saptanmıştır.

3. 110 suşta CarbaNP testiyle 82 (%74,5)'sinde pozitif, 28 (%25,5)'inde negatif bulunmuştur.

4. CarbaNP testinin duyarlılığı %91,4, özgüllüğü %82,5, PPD %90,1, NPD %84,6 olarak saptandı.

5. 110 suşta HiChrome KPC kromojenik besiyeri kullanılarak yapılan test sonucuna göre 73 (%66,4) suş pozitif, 37 (%33,6) suş negatif saptandı.

6. HiChrome KPC kromojenik besiyeri testinin duyarlılığı %89,7, özgüllüğü %62,5, PPD %79,5, NPD %67,6 olarak saptandı.

7. 110 suşta MAST disk test sonucuna göre 74(%67,3) suş pozitif, 13(%32,7) suş negatif bulunmuştur.

8. MAST disk testinin duyarlılığı %96,4, özgüllüğü %77,5, PPD %90,5, NPD %91,6 olarak saptandı.

9. MAST disk test sonuçları, CarbaNP testi sonuçları benzer benzerlik göstermiştir.

10. MHT sonuçları, HiChrome KPC kromojenik besiyeri testinin sonuçlarına göre performansı daha iyi saptanmıştır.

11. MAST disk test sonuçlarına göre suşlarda sıklık sırasına göre OXA-48, MBL ve KPC karbapenemaz türü saptandı.

12. Çalışmada enfeksiyon hastalıkları kliniği çocuk hastanesinden gelen örneklerde üreyen suşlarda KPC karbapenemaz saptanmamıştır. Diğer servislerde sırasıyla OXA-48, MBL ve KPC karbapenemaz saptanmıştır.

13. En sık karbapenemaz türü *Klepsiella* türlerinde tespit edilirken diğer türler *E coli*, *Protesu* ve *Enterobacter* olmak üzere sıralanmıştır.

Çalışmamızın bütçe kısıtlılığımızdan dolayı daha geniş izolat sayısını çalışmaya dahil edemedik. Sonuç olarak çalışma sonunda elde ettiğimiz bilgilerle hastanemizin çeşitli birimlerinde karbapenem direnç profili kısmen olsa da belirlenmiştir. Bu tedavi ve enfeksiyon kontrol önlemleri için yol gösterici olacak, ileri zamanda yürütülecek çalışmalara ışık tutacaktır



KAYNAKLAR

- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries. *Euro Surveill* 2015;20(45).
- Bayramoğlu G, Uluçam G, Gençođlu Özgür Ç, Kılıç AO, Aydın A. *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemazların saptanmasında modifiye Hodge testi ve CarbaNP testlerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016;50:1-10.
- Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012;74(1):88-90.
- Canto'nR,Ako'va M, Carmeli Yet al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18: 413 – 31.
- Canto'nR,Ako'va M, Carmeli Yet al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012;18: 413 – 31.
- Carroll KC, Weinstein MP. Laboratory Detection of Bacteremia and Fungemia. In: Murray PR, Baron EJ, Jaroensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 11th ed., Washington DC USA, ASM Press 2014;15-28.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, PA, USA, 2017
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis* 2011;11(5):381-93.
- Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, et al. Multicenter Performance Assessment of CarbaNP Test. *J Clin Microbiol* 2017;55(6):1954–1960.
- Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β -lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and

- carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother* 2012;67(8):1865-1875.
- Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Baysan BÖ et al. Türkiye'de 2014 Yılı İçinde İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Escherichia colive Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2016;50(1):021-033.
- Daikos GL, Tsaousi S, Tzouvelekis L Set al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by anti-biotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:2322-8
- David Greenwood, Richard C B Slack, Michael R. Barer, Will L Irving Elsevier Health Sciences, Medical Microbiology 12. Baskı, Birleşik Krallık, Churchill Livingstone 2012;84-93.
- Diana Doyle, Gisele Peirano, Christine Lascols, Tracie Lloyd, Deirdre L. Church, a,b and Johann D. D. Pitout. Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 3877–3880.
- Dijk K, Voets G, Scharringa J, Voskuil S, Fluit Ad, Rottier W, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid, and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):345-349.
- Dora E. Wiskirchena, Jared L. Crandon, David P. Nicolau. Impact of various conditions on the efficacy of dual carbapenem therapy against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2013:582–585
- Eisenstein BI, Zaleznik DF. *Enterobacteriaceae*. In Mandell, Bennet, and Dolin, ed. *Principle and Practices of Infectious Diseases*, 5. Baskı, Birleşik Krallık; Churchill Livingstone 2014;205-266
- Elemam A, Rahimian J, Doymaz M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2010;48:3558–62.
- Garcia-Quintanilla M, Poirel L, Nordmann P. CHROMagarSuperCARBA and RAPIDEC CarbaNP test for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2018;90(2):77-80.
- Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouvelekis LS. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(9): 4048-4050.

- Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A. Sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. Clin Microbiol Infect 2011;17(4):552-6.
- Giske CG, Martinez-Martinez L, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Simonsen GS, Zemlickova H, Cohen-Stuart J, Gniadkowski M. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST 2012.
- Güran M. Karbapenemaz Enzimleri: Türkiye'deki Durum Üzerine Bir Derleme. Turkiye Klinikleri J Med Sci 2016;36(2):98-105
- Haley J. Morrill, Jason M. Pogue, Keith S. Kaye and Kerry L. LaPlante. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. Open Forum Infect Dis 2015;52(2):50-59
- Helen Giamarellou. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: how to treat and for how long. International Journal of Antimicrobial Agents 2010;S50–S54
- Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect 2014;20(9):839-53.
- Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2009;22(1):161-82.
- Karen C. Carroll and Jeffery A. Hobden Enteric Gram-Negative Rods (*Enterobacteriaceae*) In: Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27 baskı, ABD, McGraw-Hill 2016;229-241.
- Kaushik M, Kumar S, Kapoor RK, Viridi JS, Gulati P. Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. Int J Antimicrob Agents 2018;51(2):167-176.
- Krisztina M. Papp-Wallace, Andrea Endimiani, Magdalena A. Taracila and Robert A. Bonomo. Carbapenems: Past, Present, and Future. Ant Agents and Chemtrpy 2011;55(11):4943-4960.
- Kumar S. *Enterobacteriaceae: Escherichia, Klebsiella, Proteus* and Other Genera In: Kumar S. Textbook of Microbiology 1 baskı, London, Birleşik Krallık, Jaypee Brothers Medical Pub 2012;208-239

- Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010;10(9): 597-602.
- Lee Y, Choi H, Yum JH, Kang G, Bae IK, Jeong SH, Lee K. Molecular mechanisms of carbapenem resistance in *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Korea and clinical outcome. *Ann Clin Lab Sci* 2012;42(3):281-286.
- Lucia De Florio, Annalisa Giona, Etleva Dedej, Marta Fogolari, Eleonora Cella, et al. MALDI-TOF MS Identification and Clustering Applied to *Enterobacter* Species in Nosocomial Setting. *Front Microbiol* 2018;9:1885.
- Lund BA, Thomassen AM, Carlsen TJO1, Leiros HKS. Structure, activity and thermostability investigations of OXA-163, OXA-181 and OXA-245 using biochemical analysis, crystal structures and differential scanning calorimetry analysis. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* 2017;1:73(Pt 10):579-587.
- Mainii J. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol* 2013;15:152(1-2):2-12
- Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32 Suppl 4:4-9.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010;16(2):112-22.
- Munita J M, Arias Cesar A. Mechanisms of Antibiotic Resistance *Microbiol Spectr* 2016;4(2):101-128
- Munoz-Bellido JL, Alonzo Manzanares M, Martinez Andres JA, Gutierrez Zufiaurre MN, Ortiz G, Segovia Hernández M, Garcia-Rodriguez JA. Efflux pump-mediated quinolone resistance in *Staphylococcus aureus* strains wild type for *gyrA*, *gyrB*, *grlA*, and *norA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999;43(2):354-366.

- Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012;18: 263 – 272
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012;18(5):432-438
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1791-1798
- Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2013;68(3):487-489.
- Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:1.
- Onur K, Meltem K, Deniz EK, Işın A. Evaluation of the performances of Mast and Rosco phenotypic carbapenemase detection kits for *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying carbapenemase genes. 26. 26th European Congress Of Clinical Microbiology And Infectious Diseases2016:EV0433
- Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38(1):71-78.
- P.M. Hawkey. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *Journal of Hospital Infection* 2015;241-247
- Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccone D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2. *Emerg Infect Dis* 2008;14(7):1178-1180.
- Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, Orega S, Wilkinson K, Woodford N, Zhang J, Livermore DM, Abbasi SA, Raza MW. Prevalence of faecal carriage of *Enterobacteriaceae* with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother* 2011;66(10):2288-2294.
- Pitout JD. Multiresistant *Enterobacteriaceae*: new threat of an old problem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008;6(5):657-669
- Poeylout-Palena AA, Tomatis PE, Karsisiotis AI, Damblon C, Mata EG, Vila AJ. A minimalistic approach to identify substrate binding features in B1 Metallo-beta-lactamases. *Bioorg Med Chem Lett* 2007;17(18):5171-5184.

- Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. The rapid spread of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resist Updat* 2016;29:30-46.
- Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010;65(7):1319-1321.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-458.
- Rudresh S M, Ravi G S, Sunitha L, Hajira S N, Kalaiarasan E, Harish B N. Simple, rapid, and cost-effective modified CarbaNP test for carbapenemase detection among Gram-negative bacteria *J Lab Physicians* 2017;9(4): 303–307.
- Rodríguez-Baño J, Cisneros JM, Gudiol C, Martínez JA. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2014;32 Suppl 4:49-55.
- Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of Infections Caused by Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-AmpC and Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Rev* 2018 Feb 14;31(2).
- Rood IGH, Li Q. Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2017;89(3):245-250.
- Sakanashi D, Makoto K, Yuki U, Mitsuru N, Yuki H, Hiroyuki S, Mao H, Naoya N, Nobuhiro A, Yusuke K, Yuka Y, Hiroshige M. Evaluation of commercial phenotypic assays for the detection of IMP- or New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Japan. *J Infect and Chemother* 2017;23(7):474 – 480
- Saito R, Koyano S, Dorin M, Higurashi Y, Misawa Y, Nagano N, Kaneko T, Moriya K. Evaluation of a simple phenotypic method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Microbiological Methods* 2015;108:45–48.
- Serap SY, Banu K, Havva A, Sükran Ö. Performance of CarbaNP and CİM tests in OXA-48 Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 2017;64 (1):9–16.
- Sheu CC, Lin SY, Chang YT, Lee CY, Chen YH, Hsueh PR. Management of infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing

Enterobacteriaceae: current evidence and future prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2018;16(3):205-218.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1. <http://www.eucast.org/>, 2013

Armand-Lefèvre L, Andremont A, Ruppé E. Travel and acquisition of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Med Mal Infect* 2018;48(7):431-441.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25: 682 – 707.

Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence* 2017;8(4):460-469.

Ventola, C. Lee. “The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Management Strategies and New Agents.” *Pharmacy and Therapeutics* 2015;344–352.

Wiskirchen DE, Crandon JL, Nicolau DP. Impact of various conditions on the efficacy of dual carbapenem therapy against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 2013;41: 582 – 5

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1151-1161.

Zarakolu P, Day KM, Sidjabat HE, Kamolvit W, Lanyon CV, Cummings SP, Paterson DL, Akova M, Perry JD. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID OXA-48, for recovery of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from patients at a university hospital in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(3):519-525.

Zhanel GG1, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative Review of the Carbapenems. *Drugs* 2007;67(7):1027-52.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Emin Guluzade

Doğum Yeri: Azerbaycan

Doğum Tarihi: 13.06.1983

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce, Rusça

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Azerbaycan Tıp Üniversitesi

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

E-posta: dreminguluzade@gmail.com