



T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ESHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Dr. Zülal Zeynep YURDAKUL

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2026

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ BAKIRKÖY DR. SADİ KONUK SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

ESHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

Dr. Zülal Zeynep Yurdakul

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Zeynep Çizmeci

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İSTANBUL-2026

TEŞEKKÜR

Bu uzmanlık tez çalışmasının planlanmasından sonuçlandırılmasına kadar geçen tüm süreçte bilgi birikimi, bilimsel titizliği ve yol gösterici yaklaşımıyla bana rehberlik eden; her aşamada desteğini, güvenini ve emeğini hissettiren tez danışmanım Doç. Dr. Zeynep Çizmeci' ye en içten teşekkürlerimi sunarım. Süreç boyunca yalnızca akademik açıdan değil, motivasyonumu korumam ve doğru şekilde ilerleyebilmem açısından da bana güç veren yaklaşımı, yapıcı geri bildirimleri ve sabrı sayesinde bu çalışmayı tamamlayabildim.

Tez çalışmamın yürütülmesi sırasında desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Damla Köklü ve Uzm. Dr. Emine Hoşaf 'a birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve laboratuvar süreçlerinde emeği geçen tüm laboratuvar çalışanlarına teşekkür ederim.

Mikrobiyolojiye ilk başladığım dönemde sabırla öğreten, her sorumda destek olan ve yaklaşımıyla bu alanı sevmemi sağlayan Doç. Dr. Hülya Duran'a ayrıca teşekkür ederim.

Hayatım boyunca varlığıyla güç aldığım babam Cengiz UTKULU' yu sevgi, saygı ve özlemle anıyorum. Yanımda olmasa da, bana kattıkları ve hatırası bu süreçte en büyük güç kaynaklarımdan biri oldu.

Her koşulda beni seven, destekleyen ve daima yanımda olan annem Emine UTKULU' ya, kardeşlerim Ali Bilal UTKULU ile Ahmet Emir UTKULU' ya ve tüm aileme sevgilerimi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreçte yanımda olan ve desteğini her zaman hissettiren eşim Yusuf YURDAKUL 'a ayrıca gönülden teşekkür ederim. Tez sürecinde yalnızca manevi olarak değil, çalışmanın ilerlemesine aktif katkı sunarak; yoğun ve stresli dönemlerde beni motive edip güç vererek her koşulda yanımda olmuştur. Emekleri ve desteği benim için çok değerlidir.

Zülal Zeynep YURDAKUL

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**

KISALTMALAR ..... **vi**

TABLO LİSTESİ ..... **ix**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**

ÖZET ..... **xiii**

ABSTRACT ..... **xv**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. *E. COLİ* GENEL ÖZELLİKLER VE KLİNİK ÖNEMİ **4**

2.1.1. *E. coli* 'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar 4

2.1.2. *E. coli* Laboratuvar Tanısı 5

2.1.3. *E. coli* Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Antibiyotik Direnci 6

2.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER VE DİRENÇ MEKANİZMALARI **7**

2.3. BETA-LAKTAMAZLAR **9**

2.4. KARBAPENEMLER VE DİRENÇ MEKANİZMALARI **12**

2.5. KARBAPENEMAZLAR **13**

2.5.1. A Sınıfı Karbapenemazlar 13

2.5.2. B Sınıfı Karbapenemazlar 14

2.5.3. D Sınıfı Karbapenemazlar 15

2.6. KARBAPENEM DİRENCİ EPİDEMİYOLOJİSİ VE ÖNEMİ 17

2.7. KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ TARAMA YÖNTEMLERİ 21

2.8.KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ FENOTİPİK DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ 22

2.8.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Türevleri 23

2.8.2. Kombinasyon Disk Testi 24

2.8.3. Biyokimyasal Kolorimetrik Testler 25

2.8.4. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (MALDİ-TOF MS) 25

2.8.5. Lateral Akım Yöntemleri (İmmunokromatografik testler) 26

2.8.6. Diğer Yöntemler 26

2.9. KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ GENOTİPİK DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ 27

3. GEREÇ VE YÖNTEM 29

3.1. ÇALIŞMA İZOLATLARININ SEÇİMİ VE İŞ AKIŞI 29

3.2. GENOTİPİK YÖNTEM İLE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI 32

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu 32

3.2.2. Multipleks Gerçek Zamanlı PCR Çalışılması 35

3.2.3. PCR Sonuçlarının Değerlendirilmesi 37

3.3. FENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI 38

3.3.1. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) 38

3.3.2. Hızlı Karbapenemaz Tespit Yöntemi (rCDM) 41

3.3.3. Kombinasyon Disk Testi 46

3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI 47

3.4.1. Kolistin Duyarlılık Testi Çalışılması 47

3.4.2. Diğer Antibiyotikler İçin Duyarlılık Testlerinin Çalışılması 49

3.5. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 51

4. BULGULAR 53

4.1. ARAŞTRIMA POPÜLASYONUNUN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ 53

4.2. MULTİPLEKS GERÇEK ZAMANLI PZR SONUÇLARI 56

4.3. PZR SONUÇLARINA GÖRE OTOMATİZE SİSTEM VE DİSK DİFÜZYON TARAMA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ 61

4.4. MODİFİYE KARBAPENEM İNAKTİVASYON METODU SONUÇLARI 68

4.5. HIZLI KARBAPENEMAZ TESPİT METODU SONUÇLARI 70

4.6. KOMBİNASYON DİSK TESTİ SONUÇLARI 79

4.7. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI 83

5. TARTIŞMA 88

6. SONUÇ 107

KAYNAKLAR..... 110

ÖZGEÇMİŞ..... 121

EKLER..... 123

KISALTMALAR

ABD : Amerika Birleşik Devletleri

ATCC : American Type Culture Collection (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu)

ATLAS : Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (Antimikrobiyal Test Lideri ve Sürveyans Programı)

CAMHB : Katyon ayarlı Müeller Hinton Broth

CDC : Centers for Disease Control and Prevention, ABD (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi)

CIM : Karbapenem İnaktivasyon Metodu

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü)

CMY : Cephamycinase

CTX-M : Cefotaximase Munich

Cq : Quantification Cycle

DHA : Dhahran Hospital AmpC

DNA : Deoksiribonükleit Asit

DPA : Dipikolinik Asit

E. coli : *Escherichia coli*

ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control (Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi)

eCIM : Etilendiamintetraasetik Asit ilaveli CIM

EARS-NET : European Antimicrobial Resistance Surveilliance Network (Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı)

EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi)

EUSCAPE : European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*

GSBL : Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

IMP : Imıpenemase

KDE : Karbapenem Dirençli *Enterobacterales*

K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*

KDT : Kombinasyon Disk Testi

KSDE : Kolistin Sıvı Disk Elüsyon

KPC : *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MALDI-TOF MS : Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi

MBL : Metallo Beta-Laktamaz

mCIM : Modifiye CIM

MHA : Müeller Hinton Agar

MIR: Moxalactam-inducible beta-lactamase (moxalaktam ile indüklenebilir beta-laktam direnci)

MİK : Minimal İnhibitör Konsantrasyon

NCTC : National Collection of Type Cultures (Ulusal Tip Kültürleri Koleksiyonu)

NDM : New Delhi Metallo Beta-Laktamaz

NTC : Negatif Kontrol

OXA : Oxacilinase (Oksasilinaz)

PBA : Fenilboronik Asit

PBP : Penisilin Bağlayıcı Proteinler

PC : Pozitif Kontrol

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

rCDM : Rapid Carbapenemase Detection Method (Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu)

RFU : Relative Fluorescence unit (Bağıl Florans Birimi)

SHV : Sulfhydryl Variable beta-lactamase

SMART : Study for Monitoring Antimicrobial Resistance (Antimikrobiyal Direnç Eğilimlerini İzleme Çalışması)

STL-B : Sample/Tissue Lysis Buffer

SUAM : Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

TEM : Temoniera

TMO : Temosilin

TSB : Triptik Soy Buyyon

TSI : Triple Sugar Iron Agar (Üç Şekerli Demir Agar)

UAMDS : Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi

VIM : Verona Integron kodlu Metallo-beta-laktamaz

qPCR : Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

WHO : World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)

TABLOLAR

Tablo 1. Bush–Jacoby Beta-laktamaz Sınıflaması ile Ambler Sınıflamasının Karşılaştırılması 10
Tablo 2. Başlıca karbapenemaz tiplerinin genel özellikleri..... 16
Tablo 3. Karbapenemaz doğrulama yöntemleri avantaj ve dezavantajları..... 28
Tablo 4. EUCAST önerilerine göre karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için meropenem ve ertapenem klinik sınır ve tarama eşik değerleri 30
Tablo 5. Karbapenem direnç geni saptanmasında uygulanan qPCR programı işlem basamakları 35
Tablo 6. qPCR için reaksiyon karışımı bileşenleri ve hedef genler 37
Tablo 7. Modifiye Karbapenem İnhibisyon Metodu (mCIM) değerlendirme kriterleri 41
Tablo 8. Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu (rCDM) değerlendirme kriterleri 46
Tablo 9. Kombinasyon Disk Testi değerlendirme kriterleri..... 47
Tablo 10. *Enterobacterales* için Kolistin MİK klinik sınır değerleri..... 49
Tablo 11. *E. coli* izolatlarında seftazidim-avibaktam, tigesiklin ve fosfomisin için klinik sınır değerler (EUCAST'e göre)..... 50
Tablo 12. Tanısal performans değerlendirilmesinde kullanılan dört gözlü tablo yapısı 52
Tablo 13. Karbapenemaz tiplerine göre hastalara ait demografik bilgiler 60
Tablo 14. Çalışma izolatlarının meropenem ve ertapenem ile karbapenemaz tarama sonuçları 63
Tablo 15. Karbapenem direnç geni pozitif ve negatif saptanan izolatların EUCAST tarama sınır değerlerine göre otomatize sistem ve disk difüzyon sonuçları 67
Tablo 16. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) ile PZR sonuçlarının karşılaştırma tablosu 69
Tablo 17. Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu (rCDM) ile PZR sonuçlarının karşılaştırma tablosu 72
Tablo 18. PZR ile karbapenem direnç geni pozitif ve negatif saptanan izolatlarda rCDM ve mCIM test sonuçları..... 73
Tablo 19. rCDM ve mCIM testleri arasındaki uyum analizi 74

Tablo 20. Çalışmaya dahil edilen 138 izolatın multipleks gerçek zamanlı PZR, rCDM, mCIM sonuçları ve zon çapları 74
Tablo 21. Karbapenem direnç genlerine göre izolatların kolistin, seftazdim-avibaktam, fosfomisin ve tigesiklin duyarlılık sonuçları 87

ŞEKİLLER

Şekil 1. Avrupa bölgesinde *E. coli* izolatlarında karbapenem (imipenem/meropenem) direnci dağılımı, 2024 (ECDC-WHO AMR Report 2025) 19
Şekil 2. Gereç-yöntem için iş akış şeması 31
Şekil 3. Hızlı nükleik asit ekstraksiyonu işlem basamakları 34
Şekil 4. 48 örnek kapasiteli Mic qPCR cihazı 35
Şekil 5. PZR reaksiyonu için kullanılan OXA, CRE ve qPCR Oligomiksleri 36
Şekil 6. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) uygulama basamakları 40
Şekil 7. Hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM) için besiyerlerinin hazırlanması 44
Şekil 8. Hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM) uygulama basamakları 45
Şekil 9. *E. coli* izolatlarının poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı 53
Şekil 10. *E. coli* izolatlarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı 54
Şekil 11. Klinik örneklerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı 55
Şekil 12. *E. coli* izolatlarında karbapenemaz tiplerinin dağılımı (n) 56
Şekil 13. Threshold döngü sayısı (Cq) ≤ 26 ve RFU değeri ≥ 0.5 saptanan sigmoidal eğriler 57
Şekil 14. Karbapenemaz pozitif izolatların poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı 58
Şekil 15. Karbapenemaz tiplerinin örnek türlerine göre dağılımı 61
Şekil 16. Karbapenemaz tiplerine göre izolatların ertapenem zon çaplarının (mm) dağılım grafiği 64
Şekil 17. Karbapenemaz tiplerine göre izolatların meropenem zon çaplarının (mm) dağılım grafiği..... 65
Şekil 18. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) sonuçları ……..68
Şekil 19. Hızlı karbapenemaz saptama yöntemi (rCDM) sonuçları (5 ve 6 saat)..... 71
Şekil 20. Karbapenemaz pozitif ve negatif saptanan *E. coli* izolatlarının rCDM ve mCIM inhibisyon zon çapları..... 78
Şekil 21. Kombinasyon disk testi (KDT) sonuçları 81

Şekil 22. Karbapenemaz negatif saptanan temosilin dirençli iki izolatın kombinasyon disk testi sonucu 82
Şekil 23. GSBL için A. Kombine disk testi ve B. Çift disk sinerji testi sonuçları 83
Şekil 24. Kolistin duyarlılığı A. Sıvı disk elüsyon metodu (MİK: <1 µg/ml) B. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi (MİK: 0,25 µg/ml) sonuçları 85

ESHERİCHİA COLİ İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE SAPTANMASI

ÖZET

Amaç: Son yıllarda karbapeneme dirençli *E. coli* izolatları giderek artan sıklıkta bildirilmeye başlanmıştır. Özellikle OXA-48 gibi karbapenemazların baskın görüldüğü bölgelerde, karbapenemazlar izolatlarda belirgin "yüksek direnç" fenotipi oluşturmadan da bulunabildiğinden tarama stratejisinin doğru kurgulanması önem kazanmaktadır. Bu çalışmada, karbapenem tarama kriterlerini karşılayan *E. coli* izolatlarında karbapenemaz üretiminin genotipik ve fenotipik yöntemlerle saptanması ve tanısal performanslarının değerlendirilmesi yanında tedavide kullanılabilecek antibiyotiklere duyarlılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza Ocak 2021–Haziran 2025 tarihleri arasında SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilerek tanımlama ve antibiyogram duyarlılıkları VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) otomatize sistemi ile çalışılan, meropenem ve ertapenem tarama eşik değerinin altında bulunan 138 *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. Tüm izolatlara karbapenemaz saptanması için qPCR ticari kiti (Bioseksen, Türkiye) kullanılarak gerçek zamanlı multipleks PZR, fenotipik yöntemlerden mCIM, rCDM ve kombinasyon disk testleri (Liofilchem S.r.l., İtalya) uygulanmıştır. PZR altın standart kabul edilerek fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri hesaplanmıştır. Testler arasındaki uyumun analizinde Cohen's Kappa, farklılıkların analizinde McNemar testi ayrıca çalışmadaki kategorik değişkenler arasındaki farkların istatistiksel analizinde Ki-kare testi uygulanmıştır.

Seftazidim-avibaktam, ve fosfomisin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemiyle; tigesiklin duyarlılığı gradyent test ile, kolistin duyarlılığı ise disk elüsyon testi ile çalışılarak duyarlılık oranları yüzdesel olarak hesaplanmıştır.

Bulgular: *E. coli* izolatının 104'ünde (%75,4) PZR ile en az bir karbapenem direnç geni saptanmıştır. Karbapenemaz pozitif izolatlar arasında en sık OXA-48 geni (78, %75) saptanırken, 17'inde (%16,3) NDM, 7'inde (%6,7) OXA-48 + NDM

birlikteliği, birer izolatta ise (%1) KPC ve KPC+NDM birlikteliği saptanmıştır. PZR esas alındığında, mCIM duyarlılığı %99, özgüllüğü %100 ve rCDM'nin ise duyarlılığı %93,3, özgüllüğü %100 bulunmuştur. mCIM ve rCDM testinin arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı, biribirleri arasında ve altın standart yöntem PZR ile "mükemmel uyum" gösterdiği saptanmıştır. KDT'nin ise duyarlılığı %98,7 ve özgüllüğü %94,1 bulunmuştur. Karbapenemaz pozitif *E. coli*'ler kolistine %100, tigesikline %85,6, fosfomisine %96,1, seftazidim-avibaktama ise %100 duyarlılık saptanmıştır.

Sonuç: Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında OXA-48 geninin baskın olduğu ve OXA-48'in tespitinde ertapenemin meropeneme kıyasla daha duyarlı bir gösterge olduğu gösterilmiştir. NDM ve ikili gen pozitifliği yüksek oranları dikkat çekicidir. Fenotipik karbapenemaz tespit yöntemleri arasında en yüksek tanısal performansı mCIM göstermiştir. rCDM'nin ise duyarlılığı mCIM'e kıyasla daha düşük bulunmasına rağmen, karbapenemaz tespitinde birbirlerinin yerine güvenle kullanılabilecek ve doğrulayıcı test olarak tercih edilebilecek yöntemler oldukları gösterilmiştir. KDT'nin özellikle ikili gen pozitifliklerinde tanısal hataları minimalize etmek için genotipik doğrulama ile desteklenmesi gerekebilmektedir. Moleküler testler referans alınarak elde edilen bu bulgular, özellikle kaynakları sınırlı olan laboratuvarda mCIM, rCDM, KDT gibi uygulanabilecek fenotipik yöntemlerin karbapenemazların hızlı, doğru ve güvenilir saptanabilmesi için belirlenecek stratejilere yol gösterici olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Karbapenemaz pozitif *E. coli*, mCIM, rCDM, kombinasyon disk testi, multipleks gerçek zamanlı PZR

PHENOTYPIC and GENOTYPIC DETECTION of CARBAPENEM RESISTANCE in *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES

ABSTRACT

Aim: In recent years, carbapenem-resistant *E. coli* isolates have been reported with increasing frequency. Particularly in regions where carbapenemases such as OXA-48 are prevalent, carbapenemases can be present in isolates without producing a distinct “high resistance” phenotype, making the proper design of screening strategies crucial. This study aimed to detect the presence of carbapenemases in *E. coli* isolates meeting carbapenem screening criteria using genotypic and phenotypic methods, evaluate their diagnostic performance, and determine their susceptibility to antibiotics that could be used in treatment.

Materials and Methods: Our study included 138 E. coli isolates that were isolated from various clinical samples sent to the SBÜ Bakırköy Dr. Sadi Konuk SUAM Medical Microbiology laboratory between January 2021 and June 2025, and whose identification and antibiogram susceptibilities were determined using the VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l’Étoile, France) automated system, and which were below the meropenem and ertapenem screening threshold values. Real-time multiplex PCR was performed using a commercial qPCR kit (Bioseksen, Turkey) to detect carbapenemase in all isolates, along with phenotypic methods such as mCIM, rCDM, and combination disk tests (Liofilchem S.r.l., Italy). PCR was accepted as the gold standard, and the sensitivity and specificity of the phenotypic tests were calculated. Cohen's Kappa was used to analyze the agreement between the tests, the McNemar test was used to analyze the differences, and the chi-square test was used for the statistical analysis of the differences between the categorical variables in the study. Susceptibility rates were calculated as percentages using the following methods: susceptibility to ceftazidime-avibactam and fosfomycin was determined using the disk

diffusion method; susceptibility to tigecycline was determined using the gradient test; and susceptibility to colistin was determined using the disk elution test.

Results: At least one carbapenemase gene was detected by PCR in 104 (75.4%) *E. coli* isolates. Among carbapenemase-positive isolates, the OXA-48 genotype was the most common (78, 75%), while NDM was detected in 17 (16.3%), OXA-48 + NDM co-producing in 7 (6.7%), and KPC and KPC + NDM co-producing in one isolate each (1%). Based on PCR, the sensitivity of mCIM was 99%, specificity was 100%, and the sensitivity of rCDM was 93.3%, specificity was 100%. No statistically significant difference was found between the mCIM and rCDM tests, and they showed "excellent agreement" with each other and with the gold standard method PCR. The sensitivity of KDT was found to be 98.7% and its specificity 94.1%. Carbapenemase-positive *E. coli* were found to be 100% sensitive to colistin, 85,6% to tigecycline, 96.1% to fosfomycin, and 100% to ceftazidime-avibactam.

Conclusion: Our study demonstrated that the OXA-48 gene is predominant in E. coli isolates and that ertapenem is a more sensitive indicator than meropenem for detecting OXA-48. The high rates of NDM and dual gene positivity are noteworthy. These findings, obtained using molecular tests as a reference, will guide the strategies to be determined for the rapid, accurate, and reliable detection of carbapenemases using phenotypic methods such as mCIM, rCDM, and KDT, especially in laboratories with limited resources.

Key words: Carbapenemase-positive *E. coli*, mCIM, rCDM, combination disk test, multiplex real-time PCR

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotiklerin gereğinden fazla veya yanlış kullanımı nedeniyle tüm dünyada giderek artan çoklu antibiyotik direnci, World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü-WHO) tarafından da halk sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biri olarak tanımlanmıştır. Bu kapsamda, hem toplum hem de sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarının önde gelen etkenleri arasında yer alan *Enterobacterales* türlerinde antimikrobiyal direncin yaygınlaşması kaygı vericidir (1). *Enterobacterales* içinde yer alan *Escherichia coli (E. coli)*, insan gastrointestinal sisteminin doğal flora üyesi olmakla birlikte, önemli bir fırsatçı patojendir. Enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen bakterilerden biri olan *E. coli,* başta üriner sistem enfeksiyonları olmak üzere çok çeşitli klinik tablolardan sorumludur. Gram negatif kaynaklı primer bakteriyemilerin en sık nedenlerinden biri olmakla birlikte, üriner veya intestinal enfeksiyonlara sekonder bakteriyemilere de yol açabilir. Ayrıca yenidoğan sepsisi ve menenjit vakalarının da en sık görülen nedenleri arasında yer almaktadır (2). *E. coli*, toplum kaynaklı komplike olmayan enfeksiyonlardan, sağlık bakımı ilişkili komplike enfeksiyonlara kadar uzanan geniş bir klinik spektruma sahiptir ve gelişen antimikrobiyal direnç mortalite ve morbidite oranlarında önemli artışa sebep olmaktadır (3,4).

Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacterales* enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemler son seçenek olarak kullanılmaktadır (5). Bununla birlikte bu ilaçların yaygın kullanımı, *Klebsiella* türlerinde olduğu gibi hem toplumda hem de hastane ortamında sık izole edilen bir patojen olan *E. coli*'lerde de karbapenem direncinin ortaya çıkmasına ve küresel ölçekte hızla yayılmasına yol açmaktadır (6,7).

WHO tarafından 2017 yılında yayımlanan ve 2024 yılında güncellenen "bakteriyel öncelikli patojenler" listesinde, karbapenem ve üçüncü nesil sefalosporinlere dirençli *Enterobacterales* türleri "kritik öncelikli" patojenler kategorisinde sınıflandırılmıştır (8). European Centre for Disease Prevention and Control (Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi-ECDC)'nin 2021 yılına ait verilerine dayanarak 2023 yılında yayımladığı sürveyans raporunda, Avrupa genelinde karbapenem dirençli *E. coli* izolatlarında önceki yıllara kıyasla artış eğilimi olduğu

bildirilmiştir. Raporda, Türkiye'nin de aralarında bulunduğu bazı ülkelerde bu oranların belirgin düzeylere ulaştığı ve bölgesel farklılıklar gösterdiği vurgulanmıştır (9).

Karbapenem direnci çoğunlukla karbapenemlerin hidrolizine ve minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde artışa yol açan karbapenemaz sınıfı beta laktamazlar ile ilişkilidir. Bu enzimlerin çoğunun plazmidler aracılığıyla taşınabilmesi, direncin hızla yayılmasına katkıda bulunmaktadır (10). Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin sınırlı olması, direncin erken saptanmasını kritik hale getirmektedir. Erken tanı, etkin tedavinin hızlı başlatılması, mortalite riskinin azaltılması, hastanede kalış süresinin kısaltılması ve sağlık sistemine olan mali yükün hafifletilmesi yanında direncin yayılımının azaltılması açısından da büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle, antibiyotik duyarlılık testlerinde karbapenem duyarlılığında bir azalma saptandığında, karbapenemaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılarak doğrulanması önerilmektedir (11).

Karbapenemazların saptanmasında, moleküler temelli genotipik yöntemler yüksek özgüllük ve duyarlılıkları nedeniyle 'altın standart' olarak kabul edilmektedir (11). Ancak bu yöntemlerin yüksek maliyetli olması, özel ekipman ve uzmanlık gerektirmesi nedeniyle rutin kullanımları sınırlıdır. Bu nedenle daha düşük maliyetli, kolay uygulanabilir ve farklı duyarlılık düzeylerine sahip fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Fenotipik yöntemler, ulaşılabilirlikleri ve pratik uygulanabilirlikleri sayesinde direncin tanımlanmasında ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli bir rol oynamaktadır. Enfekte hastaların ve kolonize taşıyıcıların erken ve etkin şekilde belirlenmesi ise çoklu ilaç direncinin yayılımının önlemesi ve enfeksiyon kontrolünün sağlaması açısından kritik bir öneme sahiptir (12).

Bu çalışmada, EUCAST tarafından önerilen karbapenem MİK tarama eşik değerinin üzerinde kalan *E. coli* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanması için fenotipik yöntemlerden modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM), hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM), ticari kombinasyon disk testi (KDT) ile genotipik yöntemlerden multipleks gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) uygulanmıştır. Çalışmanın temel amacı; fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerini altın standart kabul edilen genotipik yöntem ile karşılaştırarak

performanslarının değerlendirilmesi, multipleks PZR ve kombinasyon disk testi ile *E. coli* izolatlarındaki karbapenem direnç genlerinin tiplendirilmesi ve dağılım sıklığının belirlenmesidir.

Çalışmanın ikincil amacı ise, karbapenem dirençli *E. coli* enfeksiyonlarında ampirik tedaviye yol göstermek amacıyla, sınırlı tedavi seçenekleri arasında bulunan kolistin, seftazidim-avibaktam tigesiklin ve idrar izolatlarında fosfomisin duyarlılık oranlarının belirlenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. *ESCHERİCHİA COLİ*: GENEL ÖZELLİKLERİ VE KLİNİK ÖNEMİ

E. coli, *Enterobacterales* takımı içindeki *Enterobacteriaceae* ailesinin en iyi bilinen ve klinikte en sık izole edilen üyelerinden biridir. İlk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından ishalli bir çocuğun dışkısından izole edilerek tanımlanan bu bakteri, fakültatif anaerob Gram negatif basildir. Yaklaşık 4,6 milyon baz çifti büyüklüğünde bir genoma sahip olan *E.coli*, genetik plastisitesi nedeniyle antibiyotik direnç genlerini ve çeşitli virülans faktörlerini plazmid, faj veya transpozon aracılığıyla edinebilmektedir (2,13).

*E. coli'*nin patojenitesi; konak savunma mekanizmalarını aşmayı sağlayan adezyon yapıları, toksin üretimi, kapsül varlığı ve demir alım sistemleri gibi virülans faktörlerine bağlıdır. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit, dolaşıma geçtiğinde proinflamatuvar sitokinlerin salınımını uyararak sistemik inflamatuvar yanıt gelişimine neden olabilmektedir. Fimbria ve piluslar epitel yüzeylere tutunmayı ve kolonizasyonu kolaylaştırırken, özellikle Tip 1 ve P fimbrialar üropatojenik *E. coli* izolatlarında önemli rol oynamaktadır (2,13).

2.1.1. *E. coli'*nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

E. coli, gastrointestinal sistem florasının doğal bir üyesi olmakla birlikte, fırsatçı patojen olarak hem intestinal hem ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Enfeksiyon gelişimi özellikle immün sistemi baskılanmış bireylerde, ileri yaş grubunda ve cerrahi girişim geçiren hastalarda daha sık görülmektedir. *E. coli* enfeksiyonları fekal-oral yolla bulaşabileceği gibi, endojen floradan kaynaklanan yayılım sonucu da ortaya çıkabilmektedir. *E. coli'*nin sebep olduğu enfeksiyonlar, lokalizasyonlarına göre intestinal ve ekstra-intestinal enfeksiyonlar olarak sınıflandırılır.

İntestinal enfeksiyonlar, bakterinin sahip olduğu virülans faktörlerine bağlı olarak farklı klinik tablolarla seyretmektedir. Klinik spektrumu sulu ishalden kanlı

ishale kadar değişebilmekte; bazı toksin üreten suşlarda mukozal hasar ve sistemik komplikasyonlar gelişebilmektedir. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Shiga toksini üreterek ciddi kanlı kolit ile böbrek yetmezliğine kadar gidebilen hemolitik üremik sendromun başlıca nedenidir. ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*) özellikle seyahat edenlerde görülen ve "turist ishali" olarak bilinen sulu ishalin en yaygın bakteriyel etkenlerinden biridir. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) gelişmekte olan ülkelerde bebek ve çocuklarda önemli bir kronik ishal nedenidir. Enteroinvazif *E. coli* (EIEC) bakterinin bağırsak mukozasına invazyonu ile karakterize dizanteri benzeri bir klinik tablo oluşturmaktadır. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) hem çocuklarda hem de immün yetmezliği olan bireylerde inatçı ve uzun süreli ishallere yol açarken diffüz aderan *E. coli* (DAEC) ise özellikle küçük çocuklarda ishal ile ilişkilendirilmiştir (14).

Ekstraintestinal enfeksiyonlar ise klinik pratikte daha sık karşılaşılan ve daha ciddi seyir gösterebilen tabloları kapsamaktadır. *E. coli* hem toplum kökenli hem de nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının en sık sebebi olmakla birlikte, bakteriyemi ve sepsis olgularında da önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca yenidoğan menenjiti, intraabdominal enfeksiyonlar, yara yeri enfeksiyonları ve immünsupresif hastalarda pnömoni gibi çeşitli klinik tablolar *E. coli* ile ilişkili ekstraintestinal enfeksiyonlar arasında yer almaktadır (2,15).

2.1.2. *E. coli* Laboratuvar Tanısı

E. coli enfeksiyonlarının laboratuvar tanısı, enfeksiyon bölgesine uygun örneklerin alınmasıyla başlar. Alınan örneklerden hazırlanan Gram boyalı preparatların mikroskobik incelemesinde 1–3 µm uzunluğunda, 0,4–0,7 µm kalınlığında Gram negatif basil olarak görülür. Hareketli bir bakteri olan *E. coli*, klinik örneklerin seçici ve seçici olmayan besiyerlerine ekimi sonrasında 18–24 saat süreyle 35-37 °C'de aerobik koşullarda inkübe edildiğinde 1-2 mm çapında çoğunlukla S koloniler (kapsüllü olanlar M koloniler) oluşturarak ürer. Kanlı agarda genellikle hemoliz oluşturmayan koloniler gözlenirken, MacConkey agarda laktoz fermantasyonu sonucu pembe-kırmızı koloniler oluşturur. Eosin-Methylene Blue (EMB) agarda karakteristik metalik yeşil parlaklık göstermesiyle tanımlanabilir (2,16).

Tür düzeyinde tanımlamada *Enterobacteriaceae* için klasik olarak kullanılan IMVIC testleri (indol, metil kırmızısı, Voges–Proskauer ve sitrat) uygulandığında *E. coli* genellikle "+ + – –" reaksiyon paterni gösterir. Tanıyı desteklemek amacıyla Triple Sugar Iron (TSI) agar, hareketlilik ve β-glukuronidaz aktivitesi gibi biyokimyasal testlerden de yararlanılabilir (2,15).

Geleneksel tanımlamada kültür ve biyokimyasal yöntemlerin yanı sıra, günümüzde hızlı ve güvenilir tanı sağlayan modern sistemler de yaygın olarak kullanılmaktadır. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), mikroorganizmaların protein profillerini analiz ederek kısa sürede yüksek doğrulukla tür tanımlaması yapılmasına olanak tanır (17). Ayrıca VITEK 2, BD Phoenix, MicroScan gibi otomatize sistemler, hem tanımlama hem de antibiyotik duyarlılık testlerini aynı platformda gerçekleştirerek laboratuvar süreçlerini hızlandırmaktadır (16).

Moleküler tanı yöntemleri arasında yer alan PZR temelli teknikler; serotiplendirme, virülans faktörlerinin (stx1, stx2 vb.) ve antibiyotik direnç genlerinin (blaCTX-M, blaNDM, blaOXA-48 vb.) belirlenmesi yanında epidemiyolojik izlem ve çoklu ilaca dirençli suşların takibinde önemli katkılar sağlamaktadır (15,18).

2.1.3. *E. coli* Enfeksiyonlarının Tedavisi ve Antibiyotik Direnci

E. coli enfeksiyonlarının tedavisinde antibiyotik seçimi, enfeksiyonun lokalizasyonu, hastanın klinik durumu ve lokal direnç paternleri dikkate alınarak yapılmalıdır (15). Gastrointestinal sistemle ilişkili *E. coli* enfeksiyonları çoğunlukla kendini sınırlayan ishal tabloları şeklinde seyretmektedir. Ancak EHEC suşlarının neden olduğu enfeksiyonlarda antibiyotik kullanımının toksin salınımını artırabileceğinin bildirilmesi nedeniyle tedavi genellikle destekleyici yaklaşımlarla sınırlıdır (14).

En sık karşılaşılan *E. coli* kaynaklı enfeksiyonlar üriner sistem enfeksiyonlarıdır. Ampirik tedavide florokinolonlar, trimetoprim-sülfametoksazol, nitrofurantoin, fosfomisin ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları kullanılmaktadır. Ancak son yıllarda florokinolonlara ve üçüncü kuşak sefalosporinlere karşı direnç oranlarının artması, tedavi etkinliğini sınırlandırmaktadır (19). GSBL üreten *E. coli* suşlarının artışı, hem toplum kökenli hem de hastane

kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir sorun haline gelmiştir (20). GSBL üretimi başta üçüncü kuşak sefalosporinler olmak üzere birçok beta-laktam antibiyotiğe karşı dirençle ilişkilendirilir. Özellikle Sefotaksimaz Münih (CTX-M) tipi enzimler, 2000'li yıllardan itibaren küresel ölçekte en yaygın GSBL varyantı haline gelmiştir (20).

GSBL üreten *E. coli* izolatlarına karşı en etkili beta-laktam grubu antibiyotikler arasında karbapenem grubu yer alsa da, karbapenemaz üreten izolatların ortaya çıkması etkinliğini sınırlamaktadır. Karbapenemlere dirençli mikroorganizmaların etken olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kolistin, tigesiklin ve fosfomisin gibi alternatif antibiyotikler ile seftazidim-avibaktam gibi yeni beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları tercih edilmektedir. Ancak Ambler Sınıf B (metallo-beta-laktamaz) karbapenemaz üreten suşlar avibaktam ile inhibe olmadıklarından seftazidim avibaktama karşı yapısal direnç göstermektedir (21). Bu nedenle *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarının sağladığı duyarlılık test sonuçları doğrultusunda, akılcı ve bireyselleştirilmiş antibiyotik kullanımının benimsenmesi direnç gelişiminin önlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır (21).

2.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER VE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar olmak üzere temel olarak dört ana sınıfa ayrılan beta-laktam antibiyotikler bakterilerin hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösteren antibiyotik grubudur. Yapılarında bulunan ortak beta-laktam halkasına eklenen yan zincirler grupta yer alan antibiyotiklerin farmakolojik aktivitesinden sorumlu olup; farmakokinetik özelliklerini, etki spektrumlarını ve direnç profillerini belirleyen temel yapısal unsurlardır (22).

Beta-laktam antibiyotikler penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak hücre duvar yapısındaki peptidoglikan sentezini sağlayan transpeptidaz enzimini inhibe eder. Transpeptidasyonun engellenmesi, hücre duvarı sentezinin durmasına, ozmotik dengenin bozulmasına ve sonuçta bakteriyel lizise yol açar (23).

E. coli'de beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde görülen en yaygın mekanizma beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir. Bu enzimler antibiyotiğin

beta-laktam halkasını hidrolize ederek etkisiz hale gelmesine neden olmaktadır. Klinik açıdan en önemli direnç mekanizmaları arasında özellikle GSBL, kazanılmış (plazmid kaynaklı) AmpC tipi beta-laktamazlar ve karbapenemazlar yer almaktadır.

GSBL'ler, başlıca penisilinler olmak üzere üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinleri (seftriakson, sefotaksim, seftazidim, sefepim) ve monobaktamları (aztreonam) hidrolize ederler. En belirgin özellikleri, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilebilmeleridir. Bu nedenle inhibitör içeren kombinasyonlara (örn. amoksisilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktam) klinik olarak duyarlı kalabilirler. GSBL üreten suşlar genellikle karbapenemlere (imipenem, meropenem) duyarlıdır. CTX-M, Sülfhidril değişken (SHV) ve Temoneira (TEM) türevi enzimler bu grubun en yaygın üyeleridir.

Kazanılmış AmpC beta-laktamazlar ise GSBL'lerden farklı olarak, klavulanik asit gibi standart inhibitörler tarafından inhibe edilmezler. Bu enzimler de üçüncü kuşak sefalosporinleri hidrolize ederek direnç oluşturur, ancak dördüncü kuşak sefalosporinlere (sefepim) ve karbapenemlere karşı aktiviteleri genellikle zayıftır veya yoktur. Fenotipik olarak en önemli ayırt edici özellikleri, sefamisin grubu antibiyotik olan sefoksitine karşı direnç göstermeleridir. Sefoksitin direnci (MİK >8 mg/L), plazmid kaynaklı AmpC varlığı için güçlü bir belirteçtir ve kloksasilin veya boronik asit inhibitör testleri ile doğrulanabilir. CMY (Sefamisinaz), DHA (Dhahran Hastanesi) ve ACT/MIR (AmpC tip/Moxalactam-inducible beta-lactamase) gibi enzimler bu sınıfta yer alır.

Karbapenemazlar, en geniş hidroliz spektrumuna sahip enzimlerdir. Penisilinleri, sefalosporinleri, monobaktamları ve en önemlisi karbapenemleri (imipenem, meropenem, ertapenem) parçalayarak etkisiz hale getirirler. Karbapenemaz üreten suşlar, tüm beta-laktamlara yüksek düzeyde direnç gösterir. Çoğunlukla diğer antibiyotik sınıflarına da çoklu direnç gösterdiğinden tedavi seçenekleri ciddi şekilde kısıtlıdır (11,24). Beta-laktamaz üretimine ek olarak, *E.coli'*de porin kaybı veya yapısal değişiklikler ile efluks pompa sistemleri de antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonlarını düşürerek direnç gelişimine neden olabilmektedir (24,25).

2.3. BETA-LAKTAMAZLAR

Beta-laktamaz enzimleri, özellikle *Enterobacteriaceae* üyeleri başta olmak üzere pek çok Gram negatif bakteride üretilerek beta-laktam antibiyotiklere karşı en yaygın direnç mekanizmasını oluşturur. İlk kez 1940'lı yıllarda Abraham ve Chain, *E. coli* suşunda penisilini hidrolize eden enzimi tanımlamış ve "penisilinaz" olarak adlandırmıştır (26). Günümüzde ise substrat özgüllüğü, moleküler yapı, inhibitörlere duyarlılık ve hidroliz kapasitesi açısından farklılıklar gösteren 8000'den fazla beta-laktamaz varyantı tanımlanmıştır. Bu çeşitlilik, enzimlerin sistematik olarak sınıflandırılmasını gerektirmiştir. Klinik açıdan en sık kullanılan sınıflamalar Ambler'in moleküler temelli sınıflaması ile Bush, Jacoby ve Medeiros fonksiyonel sınıflamasıdır. Ambler sınıflaması beta-laktamazları moleküler yapılarına göre A,B,C ve D sınıflarına ayırırken; Bush, Jacoby ve Medeiros sınıflaması substrat profili ve inhibitör duyarlılığına dayanmaktadır (27,28).

Tablo 1. Bush–Jacoby Beta-laktamaz Sınıflaması ile Ambler Sınıflamasının Karşılaştırılması

Bush–Jacoby Grubu	Ambler Sınıfı	Enzimler	Aktif Bölge	Enzim İnhibitörleri	Bulunduğu Bakteriler
Grup 1 (Sefalosporinazlar)	C	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Serin	FBA, DPA, KL TZ ve KV*	*Enterobacterales, Acinetobacter spp.*
Grup 2a (Penisilinazlar)	A	PCI	Serin	TZ ve KV	*S. aureus*
Grup 2b (Penisilinazlar)	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Serin	TZ ve KV	*Enterobacterales*
Grup 2be (GSBL'ler)	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER-1	Serin	TZ ve KV	*E. coli, K. pneumoniae, P. mirabilis, Salmonella spp., Klebsiella spp.*
Grup 2ber (GSBL'ler)	A	TEM-50	Serin	TZ ve KV*	*Klebsiella spp.*
Grup 2d (Karbapenemazlar)	D	OXA-01, OXA-10	Serin	TZ ve KV**	*Enterobacterales*
Grup 2df (Karbapenemazlar)	D	OXA-23, OXA-48	Serin	TZ ve KV**	*Enterobacterales, A. baumannii*
Grup 2e (GSBL'ler)	A	CpaA	Serin	TZ ve KV	*Proteae*
Grup 2f (Karbapenemazlar)	A	KPC-2, SME-1, IMI-1	Serin	TZ ve KV**	*Enterobacterales*
Grup 3 (Metallo beta-laktamazlar)	B	IMP-1, VIM-2, IND-1, L1	Çinko	EDTA, DPA	*P. aeruginosa, A. baumannii*

- TZ: Tazobaktam, KV: Klavulanik asit, FBA: Fenil boronik asit, DPA: Dipikolinik asit, KL: Kloksasilin, EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

* Tazobaktam ve Klavulanik asit ile inhibe olmaz.

** Tazobaktam ve Klavulanik asite karşı değişken duyarlılık gösterir.

Enterobacteriaceae ailesinin birçok türünün kromozomlarında yapısal veya indüklenebilir olarak bulunabilen Ambler sınıf C'de yer alan aktif bölgelerinde serin içeren Grup 1 Sefalosporinazlar (AmpC β-laktamazlar), penisilinleri, sefamisin ile birlikte sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize ederken, 4. kuşak

sefalosporinleri etkilemezler. Genel olarak klavulanik asit başta olmak üzere klasik GSBL inhibitörleri ile inhibe olmazlar. Kromozomal AmpC beta laktamazlar sefoksitin ve imipenem varlığında indüklenebilirken, plazmid aracılı AmpC'ler indüklenmezler.

E. coli'de, AmpC ekspresyonunun regülasyonu diğer *Enterobacteriaceae* türlerinden büyük farklılıklar gösterir. *E. coli* izolatlarında görülen kromozomal AmpC beta laktamaz zayıf bir promotörün ve güçlü bir baskılayıcı gen bölgesinin kontrolü altında düşük düzeyde eksprese edilir ancak indüklenebilir değildir. AmpC geninin promoter bölgesinde oluşabilen çeşitli mutasyonlar AmpC geninin yüksek düzeyde ekspresyonuyla sonuçlanır (28,29). Plazmid ile taşınan AmpC enzimlerinin kazanılması durumunda 3. ve 4. kuşak kuşak sefalosporinlere karşı da direnç gelişebilir. Bu durum, özellikle GSBL fenotipi ile karışabilen direnç profillerine yol açarak fenotipik tanıda zorluk oluşturabilmektedir (30).

Ambler sınıfı A ve D içerisinde yer alan Grup 2 serin β-laktamazlar; penisilinazlar, GSBL'ler, karbapenemazlar ve oksasilinazlar gibi çeşitli alt tipleri içerir (5,28). Gram-negatif bakterilerde görülen plazmid aracılı beta-laktamazları içeren Alt grup 2b'de (penisilinaz) en sık karşılaşılan enzimler TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'dir. Bu enzimler özellikle *E. coli'* de ampisilin direncinden sorumludur (5). Alt grup 2b enzimlerindeki aminoasit değişiklikleri sonucu genişlemiş substrat spektrumu kazanmış varyantları kapsayan Alt grup 2be grubunda yer alan GSBL enzimleri (ör. CTX-M, TEM ve SHV varyantları), üçüncü kuşak sefalosporinleri etkili bir şekilde hidrolize edebilmeleri nedeniyle klinik açıdan kritik öneme sahiptir. GSBL'lerin sürekli olarak yeni varyantlarla çeşitlenmesi, alt grup 2be'nin ve dolayısıyla Grup 2'nin genişlemesine neden olmaktadır. Bu durum, toplum ve hastane kökenli *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) enfeksiyonlarında tedavi başarısızlıklarının önde gelen nedenlerinden biridir (5,31). CTX-M enzimleri, geç tanımlanmış olmasına rağmen günümüzde en yaygın GSBL tipini oluşturmaktadır. İlk olarak 1989'da Almanya'da bir *E. coli* izolatında saptanmış, 1990'lı yılların başında Batı Avrupa ve Güney Amerika'da eş zamanlı olarak bildirilmiştir. Ardından küresel ölçekte hızla yayılarak , hem toplum hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlarda çok sayıda salgınla ilişkilendirilmiştir (31,32). CTX-M enzimleri, TEM ve SHV kökenli GSBL'lere kıyasla üçüncü kuşak sefalosporinleri daha etkili şekilde hidrolize

etmeleriyle öne çıkmaktadır (32). Alt grup 2d oksasilin ve türevlerini hidrolize edebilen oksasilinaz enzimlerini kapsamaktadır. Bazı varyantları karbapenemlere karşı da aktivite gösterebilmektedir (28). Grup 2 serin beta-laktamazlar, hem yapısal çeşitlilikleri hem de özellikle GSBL'lerin sürekli genişlemesi nedeniyle antibiyotik direncinde en geniş ve en dinamik grubu oluşturmaktadır. Özellikle CTX-M enzimlerinin küresel ölçekte baskın hale gelmesi, bu grubun klinik ve epidemiyolojik önemini daha da artırmış ve ciddi bir halk sağlığı sorunu haline getirmiştir (28,32).

Ambler sınıf B'de yer alan Grup 3 enzimler aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurduklarından metallo-beta-laktamazlar (MBL) olarak isimlendirilmektedir. İmipenemaz (IMP), Verona İntegron kodlu Metallo-beta-laktamaz (VIM) ve New Delhi Metallo-beta-laktamaz (NDM) en sık karşılaşılan tipleridir. Aztreonam dışındaki tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen MBL'ler, özellikle karbapenem direncinde kritik rol oynamaktadır. MBL üreten *E.coli'* de en sık karbapenemlere karşı yüksek düzeyde direnç ve sınırlı tedavi seçenekleriyle ilişkili olduğu bilinen NDM tipi enzimler görülmektedir (22,33).

2.4. KARBAPENEMLER VE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Karbapenemler, beta-laktam antibiyotikleri arasında en geniş antimikrobiyal spektruma sahip olan ve beta-laktamazlara karşı en dirençli grubu oluşturur. Bu üstün özellikler, yapısal olarak 6. pozisyondaki hidroksietil yan zincirlerinden kaynaklanır (28). Klinikte en sık kullanılan karbapenemler imipenem, meropenem ve ertapenem olmakla birlikte ek olarak biapenem, doripenem, faropenem ve panipenem de bu sınıfta yer almaktadır (34). Özellikle PBP-2 ve PBP-3 olmak üzere PBP'lere yüksek afiniteyle bağlanarak hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilere karşı etkinlik gösterir. Yapısal stabilitesi, beta-laktamazlara karşı dirençli olması ve dokularda hızlı dağılım gibi özellikleri ile akut enfeksiyonların tedavisinde hızlı ve güçlü bir bakterisidal etki sağlamalarını mümkün kılmaktadır (34,35). Bununla birlikte geniş antimikrobiyal spektrumları ve güçlü bakterisidal etkileri nedeniyle yaygın ve uygun olmayan kullanımları, karbapenemlere karşı dirençli mikroorganizmaların seçilimini artırarak direnç gelişiminin hızlanmasına katkıda bulunmaktadır. Bu nedenle

karbapenemlerin akılcı antibiyotik kullanım stratejileri kapsamında, uygun endikasyonlarda ve dikkatli bir şekilde kullanılması büyük önem taşımaktadır (35).

2.5. KARBAPENEMAZLAR

Karbapenem direnci, enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla gelişmektedir. Enzimatik direncin en yaygın nedeni karbapenemaz üretimidir (35). Karbapenemazlar, beta-laktam halkasını doğrudan hidrolize ederek antibiyotiği inaktive eden enzimler olup, karbapenem direncinin en önemli mekanizmalarından biridir. Genellikle plazmid ve transpozon gibi hareketli genetik elementler aracılığıyla taşındığından hızlı yayılım gösterirler (35). Moleküler yapıları, aktif bölgelerindeki yapısal değişiklikler ve farklı inhibitör duyarlılık profili göstermeleri nedeniyle karbapenemazlar Ambler sınıflamasına göre A, B ve D sınıflarına ayrılmaktadır (33,35). Ambler sınıf C beta-laktamazlar karbapenem hidrolizine neden olamadıklarından karbapenemaz grubuna dahil edilmemektedir (36). İlk olarak 1990'lı yıllarda *K. pneumoniae* suşlarında tanımlanan karbapenemazlar, günümüzde *E. coli* ve diğer *Enterobacterales* üyelerinde de giderek artan sıklıkla rapor edilmektedir (10,33). Direnç gelişiminin enzimatik olmayan mekanizmaları arasında ise porin kaybı, effluks pompalarının aşırı ekspresyonu ve PBP'in yapısal değişiklikleri yer alır. Porin kaybı veya yapısal bozukluklar, antibiyotiklerin bakteri hücresine girişini sınırlarken, effluks pompaları ise antibiyotiklerin aktif şekilde hücre dışına atılmasını sağlar. PBP yapısında meydana gelen değişiklikler antibiyotiğin hedefe bağlanma afinitesini azaltır. Bu mekanizmalar tek başlarına genellikle düşük düzeyde direnç oluştururken, karbapenemaz üretimiyle birlikte görüldüklerinde klinik olarak yüksek düzey dirence yol açarlar (7,34). *E. coli'* de görülen karbapenem direnci çoğunlukla tek bir mekanizma ile sınırlı değildir. Sıklıkla porin kaybı ve effluks pompa aktivitesindeki artış gibi enzimatik olmayan mekanizmaların karbapenemaz üretimi ile birlikte bulunmasıyla ilişkilidir (29,33).

2.5.1. A Sınıfı Karbapenemaz

Aktif bölgelerinde serin kalıntısı bulunan A sınıfı karbapenemazlar, karbapenemler de dahil olmak üzere çok sayıda beta-laktam antibiyotiği hidrolize

edebilen serin beta-laktamazlardır. Beta-laktamaz inhibitörlerine genellikle duyarlılık gösterirler. Vaborbaktam ve avibaktam gibi yeni inhibitörlerin bu gruptaki bazı enzimler üzerinde daha etkili olduğu bildirilmektedir (35).

Bu grupta en yaygın görülen enzim hem kromozomal hem plazmid aracılı varyantları bulunan *Klebsiella pneumoniae* Karbapenemaz (KPC)'dır. İlk kez 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nin (ABD) Kuzey Carolina eyaletinde bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan KPC (37), kısa sürede ABD genelinde yaygınlaşarak en sık rapor edilen karbapenemaz haline gelmiştir. Daha sonra Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde, özellikle Yunanistan ve İtalya'da yüksek prevalans gösteren KPC, Türkiye'de ilk kez 2012 yılında Romanya'dan ülkemize sevk edilen bir hastanın trakeal aspirat örneğinden izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır. Günümüzde ortaya çıkan çoklu ilaca dirençli KPC pozitif izolatlar plazmidler aracılığıyla hızlı yayılarak yüksek mortalite oranları ve sınırlı tedavi seçenekleriyle ilişkilendirilmektedir. Başlıca *K. pneumoniae* izolatlarında görülmekle birlikte *E. coli* izolatlarında da sporodik olarak bildirilmektedir (7). Bugüne kadar 150'nin üzerinde KPC varyantı tanımlanmıştır (10).

2.5.2. B Sınıfı Karbapenemaz (Metallo Beta Laktamazlar)

B sınıfı karbapenemazlar, aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunduran ve bu nedenle MBL olarak adlandırılan enzimlerdir. Klasik beta-laktamaz inhibitörlerine (ör. klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam) dirençlidirler. Ancak aktif bölgedeki metal iyonlarını şelasyon yoluyla bağlayan etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) ve dipikolinik asit (DPA) gibi şelatörler ile inhibe edilebilmeleri ayırıcı tanı testlerinde kullanılmaktadır. B grubu karbapenemazlar kromozomal veya plazmid kökenli olabilir. Klinik açıdan en önemli MBL'ler VIM, IMP ve NDM karbapenemazlarıdır. Bu enzimler integronlar, transpozonlar veya plazmidler aracılığıyla yatay gen transferi ile hızla yayılma kapasitesine sahiptir (33).

NDM, ilk olarak 2008'de Hindistan'ın Yeni Delhi kentinde sağlık hizmeti alarak İsveç'e dönen bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. Aynı hastanın dışkı örneklerinde de NDM geni taşıyan bir *E. coli* izolatının elde edilmesi, genin plazmidler üzerinde yer aldığını ve bakteriler arasında yatay gen transferi yoluyla aktarılabildiğini ortaya koymuştur. Kısa sürede küresel

dağılım göstererek, özellikle Güney Asya'dan Avrupa ve Orta Doğu'ya hızla yaygınlaşmıştır (38). Türkiye'de NDM ilk kez 2011 yılında İstanbul'da daha önce Irak'da (Bağdat) sağlık hizmeti almış bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır (39).

NDM başta olmak üzere B sınıfı karbapenemazlar sıklıkla ek direnç genleriyle birlikte plazmidler aracılığıyla başta *K. pneumoniae* ve *E. coli* olmak üzere diğer *Enterobacterales* türleri arasında da yayılım göstermektedir. Çoklu ilaç dirençli fenotiplerin gelişimiyle ilişkili olan bu durum, günümüzde MBL'ı küresel ölçekte önemli bir halk sağlığı tehdidi haline getirmektedir (7).

2.5.3. D Sınıfı Karbapenemazlar (Oksasilinazlar)

Aktif bölgelerinde serin bulunan D grubu karbapenemazlar (OXA tipi beta-laktamazlar) oksasilin ve kloksasilini güçlü şekilde hidrolize edebilmeleri nedeniyle oksasilinazlar olarak adlandırılmaktadır. Karbapenemlere karşı düşük-orta düzeyde hidrolitik aktivite gösterirler. İmipeneme karşı etkinlikleri meropeneme kıyasla daha belirgin olabilir. Çoğu OXA enzimi, klasik beta-laktamaz inhibitörlerine karşı zayıf duyarlılık sergiler. Bazı alt tipler seftazidim, sefotaksim ve aztreonama karşı değişken duyarlılık gösterebilir (40). Genetik olarak kromozomal olabilirler veya plazmid, integron, transpozon gibi mobil genetik elementlerler aracılığıyla taşınabilirler. Klinik açıdan önemli başlıca OXA alt tipleri arasında OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-66 ve OXA-143 bulunmaktadır (41).

Enterobactericeae ailesinde ilk olarak tespit edilen OXA tipi karbapenemaz olan OXA-48, 2001 yılında İstanbul'da karbapenemler dahil tüm beta-laktamlara dirençli olan bir *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir. Günümüzde ise Avrupa, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da yaygınlık göstermekte olup, Türkiye OXA-48 için önemli bir endemik bölge olarak kabul edilmektedir. OXA-48 ve türevleri *Enterobacterales* türleri içinde ağırlıklı olarak *K. pneumoniae* ile ilişkilendirilmekle birlikte, *E.coli* izolatlarında da sıklığı giderek artan oranlarda bildirilmektedir (42).

Tablo 2. Başlıca karbapenemaz tiplerinin genel özellikleri

	KPC	**NDM**	**VIM**	**IMP**	**OXA-48**
Keşif	ABD, 1996	Hindistan, 2008	İtalya, 1997	Japonya, 1998	Türkiye, 2001
Ambler sınıflaması	A	B	B	B	D
Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması	2f	3a	3a	3a	2d, 2de, 2df
Substratları	Penisilinler Sefalosporinler Monobaktamlar Karbapenemler	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	Penisilinler Sefalosporinler Karbapenemler	Penisilinler Sefalosporinler Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler (monobaktam)	Penisilinler Karbapenemler
İnhibitörleri	Boronik asit Avibaktam Relebaktam Vaborbaktam	EDTA DPA 2-merkaptopropiyonik asit	EDTA DPA	EDTA DPA	Avibaktam
Plazmitler	ColE1 IncA/C IncF IncI2 IncR IncX	ColE10 IncA/C2 IncB/O/K/Z IncC IncFIA IncFIB IncFIC IncFII IncFIII IncHI1 IncHI2 IncHI3 IncI1 IncN, IncN1, IncN2 IncL/M IncQ1 IncP IncR IncT IncX1 IncX3 IncX4 IncY IncY1	IncA/C veya IncN grubu	IncL/M	ColKP3 IncC IncFIA(HI1) IncFII IncHI1B IncL/M IncR IncX3
Başlıca *Enterobacterales* üreticileri	*K.pneumoniae* (ST258, ST512, ST11) *E. coli*	*K. pneumoniae* (ST11, ST14, ST15, ST147) *E. coli* (ST167, ST410, ST617) *E. cloacae kompleksi*	*Enterobacter spp.* *E. coli*	*Enterobacter* türleri	*K. pneumoniae* *E. coli* *E. cloacae kompleksi*

2.6. KARBAPENEM DİRENCİ EPİDEMİYOLOJİSİ VE ÖNEMİ

Karbapenemaz üretimine bağlı görülen antimikrobiyal direnç, 1990'lı yıllardan itibaren küresel ölçekte artış göstererek özellikle yoğun bakım ünitelerinde olmak üzere sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlara, tedavi seçeneklerinin kısıtlanmasına ve mortalite oranlarının artmasına neden olan ciddi bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (7,10). Direnç genlerinin çoğunlukla plazmidler gibi mobil genetik elementler aracılığıyla taşınması, yatay gen transferi yoluyla hızla yayılımına ve karbapenem direncinin bölgesel bir sorun olmaktan ziyade küresel bir tehdit haline gelmesine neden olmaktadır (43).

Centers for Disease Control and Prevention (Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri- CDC) 2019 verilerinde "acil tehdit" kategorisinde değerlendirilen karbapenemaz üreten *Enterobacterales* türlerine bağlı yaklaşık 13.100 vaka ve 1.100 ölümün olduğu ve bu enfeksiyonların özellikle yoğun bakım gibi uzun süreli bakım ünitelerinde önemli bir mortalite riski oluşturduğu bildirilmiştir (44). WHO, 2024 yılında güncellediği "Bakteriyel Öncelikli Patojenler Listesi"nde de karbapenem dirençli ve üçüncü kuşak sefalosporin dirençli *Enterobacterales* türlerini en yüksek risk kategorisi olan "kritik öncelikli" patajenler arasında sınıflandırmıştır (8).

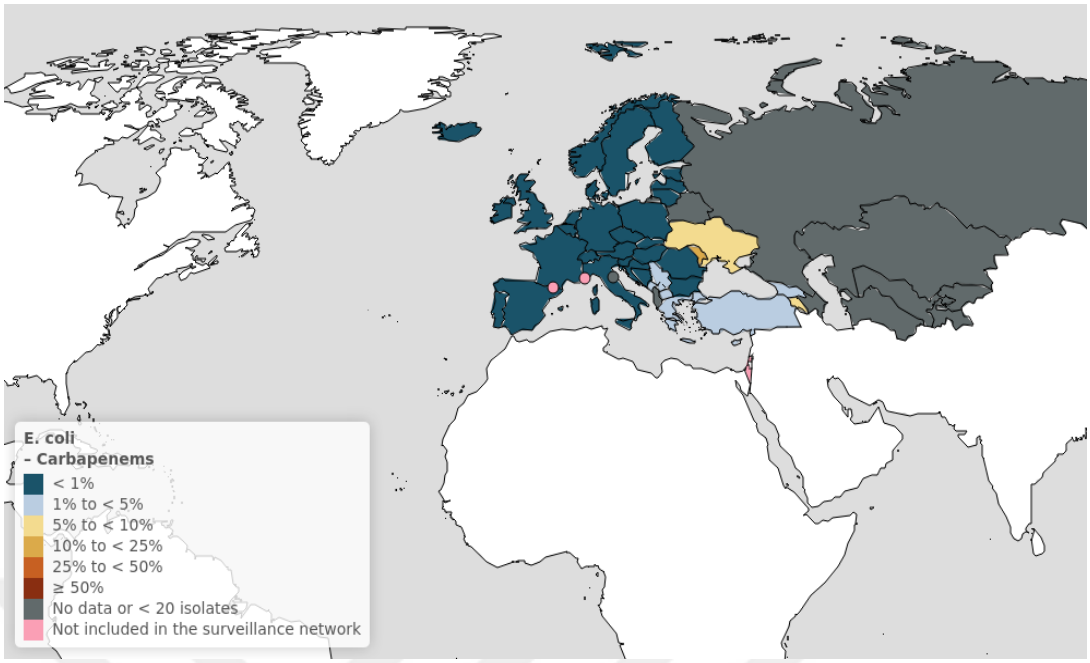
Avrupa'da karbapenemaz üreten *Enterobacterales* suşlarının dağılımında belirgin coğrafi farklılıklar bulunduğu bildirilmektedir. European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* (Avrupa Karbapenemaz Üreten *Enterobacterales* Sürveyansı-EU-SCAPE) 2020 yılı verilerine göre; OXA-48-benzeri karbapenemazların özellikle Akdeniz ülkelerinde (Türkiye, İspanya, Fransa, Malta, Yunanistan) daha baskın olduğu, KPC tipi enzimlerin başlıca İtalya ve Yunanistan'da, NDM ve VIM tiplerinin Doğu Avrupa ülkelerinde (Balkan ülkeleri, Polonya) daha yüksek sıklıkta rapor edildiğini, bununla birlikte IMP tipi karbapenemazların ise Avrupa genelinde nadir olduğu bildirilmektedir (45). Bu veriler, Avrupa'da epidemiyolojik heterojeniteyi ve OXA-48'in Akdeniz bölgesindeki hakimiyetini ortaya koymaktadır.

Türkiye'de yapılan çok merkezli bir çalışmada (2019), 28 hastaneden toplanan 509 izolat (127 *E. coli* ve 366 *K. pneumoniae*) incelenmiş ve karbapenem direnci gen dağılımı OXA-48 %52.2, KPC %16.1, NDM-1 %15.0, OXA-48 + NDM-1 %12.6, KPC + NDM-1 %2.8 olarak bulunmuştur. Bu bulgular, OXA-48'in Türkiye'de

endemik olduğunu, buna karşılık NDM-1 ve KPC 'nin daha sınırlı ancak giderek artan sıklıkta bildirilmeye başlandığını göstermektedir (46).

E. coli, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlarda *Enterobacterales* ailesi içerisinde en sık izole edilen patojenlerdendir. CDC'nin 2022 raporuna göre de, ABD'de sağlık hizmeti kaynaklı enfeksiyonlara neden olan en yaygın patojen *E. coli* iken, *K. pneumoniae* üçüncü sırada yer almaktadır (4). Küresel ölçekte karbapenemaz üreten *Enterobacterales* epidemiyolojisine bakıldığında, uzun süre *K. pneumoniae* baskın etken olarak öne çıkmış olsa da son yıllarda *E. coli'* nin bu alandaki önemi giderek artmaktadır.

ECDC ve WHO tarafından 2024 yılında yayımlanan Antimikrobiyal Direnç Raporu'na göre, 2020–2024 yılları arasında Avrupa Birliği/AEA ülkelerinde invaziv *E. coli* izolatlarında karbapenem (imipenem/meropenem) direncinin genel olarak nadir olduğu bildirilmektedir. Raporda, *E. coli* 'de karbapenem direncinin Avrupa genelinde düşük düzeylerde seyretmeye devam ettiği, ancak karbapenem direncine ait tahmini insdansların artış eğilimi gösterdiği vurgulanmaktadır. Aynı rapor kapsamında sunulan haritalarda (Şekil 1), Avrupa ortalamasının <%1 düzeyinde olduğu görülmektedir. Buna karşın Türkiye'de *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin (imipenem/meropenem) %1–5 aralığında, yaklaşık %3.5 düzeyinde bildirildiği dikkat çekmektedir (9). Bu veriler, Türkiye'de *E.coli'* de karbapenem direnç oranının düşük olmakla birlikte, Avrupa ülkelerine kıyasla yüksek düzeylerde seyrettiğini göstermektedir (47).



Şekil 1. Avrupa bölgesinde *E. coli* izolatlarında karbapenem (imipenem/meropenem) direnci dağılımı, 2024 (ECDC-WHO AMR Report 2025)(47).

Güncel veriler, *E. coli* ve *K. pneumoniae'* nin birlikte karbapenemaz üreten *Enterobacterales* izolatlarının yaklaşık %90'ını oluşturduğunu göstermektedir. Bu durum *E. coli'* lerdeki karbapenemaz üretiminin klinik ve epidemiyolojik etkisini daha da belirginleştirmektedir.

Son dönemlerde yapılan sürveyans ve genomik çalışmaları, *E. coli'* de karbapenem direncinin büyük ölçüde karbapenemaz üretimine bağlı olduğunu ve özellikle OXA-48 benzeri ile NDM enzimlerinin başlıca rol oynadığını ortaya koymaktadır. İnsan bağırsak florasında yaygın bir kommensal olan *E. coli'*ler ile çoğunlukla plazmid aracılığıyla taşınabilen bu karbapenem direnç genlerinin bir araya gelmesi, direnç genlerinin hem hastane içinde hem de toplumda hızla yayılması için uygun bir zemin oluşturmaktadır. Ayrıca *E. coli'* lerde karbapenemaz üretiminin ST167, ST410 ve ST38 gibi uluslararası yayılım gösteren klonal gruplar ile ilişkili olması, bu türün karbapenemaz epidemiyolojisinde pasif bir taşıyıcı değil, küresel direnç yayılımında aktif bir etken olduğunu düşündürmektedir (48).

Türkiye Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDS) 2022–2023 verilerine göre, invaziv *E. coli* izolatlarında imipenem ve meropenem direnci 2022'de %3, 2023' te %4 olarak bildirilmiştir. Aynı dönemde ertapenem direnci ise 2022'de %8, 2023'te %9 olarak saptanmıştır (49). Türkiye'de türe özgü moleküler

veriler sınırlı olmakla birlikte *E. coli* 'lerde görülen karbapenem direncinin çoğunlukla karbapenemaz üretimiyle ilişkili olduğu bilinmektedir. Çoklu ilaç dirençli *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonların artış göstermesi ve bu suşların insanlar arasında ve çevresel kaynaklardan fekal-oral yol ile kolaylıkla bulaşabilmesi önemli bir halk sağlığı tehdidi oluşturmaktadır. Mevcut bulgular, *E. coli* 'de karbapenem direncinin arttığını, enfeksiyon kontrolü açısından direnç mekanizmalarının iyi anlaşılmasının ve yayılımlarının önlenmesi için yakın izlemin gerekliliğini göstermektedir.

Karbapenemaz üretimine bağlı görülen antimikrobiyal dirençte en sık karşılaşılan karbapenemaz tipleri KPC, NDM, OXA-48, IMP ve VIM olup, her biri farklı antibiyotik gruplarına karşı değişen direnç profilleri sergilediğinden, genellikle antibiyotik duyarlılık testi, karbapenemaz tipleri, enfeksiyon bölgesi, enfeksiyonun şiddeti ve tıbbi öykü vb. faktörlere göre spesifik klinik tedavi seçilmektedir (43,50). Bu nedenle, yalnızca karbapenem direncinin varlığının saptanması yeterli değildir. Doğru tedavi stratejisi ve klinik yönetim için karbapenemaz üretiminin saptanması yanında tipinin de belirlenmesi büyük önem taşır.

Tedavide sıklıkla tercih edilen seftazidim-avibaktam, özellikle KPC ve OXA-48 üreten izolatlarda etkili olmakla birlikte, MBL (özellikle NDM ve VIM) üreticilerine karşı etkinliği sınırlıdır. Bu nedenle özellikle MBL pozitif izolatlarda kombinasyon tedavileri veya alternatif seçenekler gerekebilir. Aztreonam-avibaktam kombinasyonunun, KPC suşlarının yaklaşık %94'ünde, MBL suşlarının ise neredeyse tamamında etkili olduğu bildirilmektedir (51,52). Yeni nesil siderofor sefalosporin olan sefiderokolün, özellikle OXA-48 ve NDM-1 üreten *Enterobacterales* izolatlarına karşı yüksek etkinlik gösterdiği ve MBL üreticilerinde seftazidim-avibaktamdan daha üstün etkiye sahip olduğu gösterilmektedir (53). Ayrıca karbapenemaz üreten bakterilerin, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi farklı antibiyotik gruplarına karşı da çapraz direnç geliştirebildiği bilinmektedir. Bu durum karbapenemlerin yanı sıra diğer antibiyotiklerin de etkinliğini azaltarak tedavi seçeneklerinin daha da kısıtlanmasına neden olmaktadır (7). Bu nedenle karbapenemaz tiplerinin saptanması, karbapenemlerin tedavi etkinliğinin belirlenmesi yanında diğer antibiyotik gruplarına karşı olası direncin öngörülmesini sağladığından enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik sürveyans açısından da önemlidir. Ayrıca uluslararası sürveyans programları da, farklı bölgelerde görülen karbapenemaz tiplerinin sıklığını takip

ederek ve dirençli suşların yayılımının zaman içindeki değişimini izleyerek enfeksiyon kontrol önlemlerinin planlanmasına ve ampirik tedavi kararlarına rehberlik etmektedir (1). Özellikle bir bölgede baskın olan karbapenemaz tipinin bilinmesi uygun antimikrobiyal ajanların öncelikli olarak kullanımını destekleyeceğinden hem klinik hem de halk sağlığı uygulamalarında karbapenemaz üreten izolatların hızlı ve doğru tespitinin yanında karbapenemaz tiplerinin de belirlenebilmesi kritik öneme sahiptir.

2.7. KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ TARAMA YÖNTEMLERİ

Enterobacterales izolatlarında karbapenemaz üretimi direncin en yaygın mekanizmalarından biri olmakla birlikte, bu durum her zaman yüksek düzeyde bir karbapenem direnci ile sonuçlanmamaktadır. Bu nedenle yalnızca klinik sınır değerlere dayalı değerlendirmeler yapıldığında özellikle düşük düzey direnç gösteren karbapenemaz üreticisi izolatların gözden kaçmasına yol açabilmektedir (54). The European Committee on Antimicrobial Suspectibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi-EUCAST) bu riski minimize etmek için karbapenemlere duyarlılığın belirlenmesinde klinik sınır değerlerin yanında taramaya yönelik eşik değerleri de tanımlamaktadır. Karbapenemaz üreten izolatların hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesi için mevcut strateji, tarama testlerinde yüksek duyarlılığa sahip yöntemlerin (antimikrobiyal duyarlılık testi) uygulanması ve sonuçların doğrulama testleri (biyokimyasal test ve moleküler test) ile desteklenmesidir (11,55).

Karbapenemaz taramasında antibiyotik duyarlılık testlerinde EUCAST tarafından önerilen MİK değerleri ve/veya disk difüzyon zon çapları için belirlenen tarama eşik değerleri kullanılmaktadır. Bu değerlerin altında kalan karbapenemaz olasılığı yüksek olan izolatların fenotipik veya genotipik yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir.

Disk difüzyon yöntemi düşük maliyet, kolay uygulanabilirlik ve yaygın erişilebilirlik nedeniyle rutin uygulamalarda en sık tercih edilen tarama yöntemidir. Meropenem, duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan karbapenem olduğu için taramada önerilen ajandır. EUCAST'e göre, meropenem (10 µg) diski zon çapının <25 mm olması veya MİK değerinin >0,12 mg/L olması karbapenemaz üretimi ile

ilişkilendirilerek tarama açısından anlamlı kabul edilmektedir. Zon çapı 25–27 mm arasında olan izolatlar "gri alan" olarak değerlendirilir. Bu durumda karbapenemaz üretiminin saptanmasındaki duyarlılığı artırmak için piperasilin-tazobaktam ve/veya temosilin direnç paternlerine bakılması önerilmektedir. Bu antibiyotiklere direnç saptanması karbapenemaz şüphesini güçlendirerek doğrulama testi ihtiyacını desteklemektedir. (11).

Ertapenem tarama testlerinde yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen düşük özgüllüğe sahiptir ve tek başına ayırt edici bir ajan olarak değerlendirilmemelidir. EUCAST ertapenem (10 µg) için tarama eşik değerini disk difüzyon zon çapının <25 mm veya MİK >0,12 mg/L olarak bildirmektedir. Ancak karbapenemaz üreticisi olmayıp, GSBL veya AmpC üreten izolatlar da bu eşikleri aşabildiğinden yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine ve karbapenem kullanımından gereksiz yere kaçınılmasına neden olabilir. Ayrıca OXA-48 gibi ülkemizde endemik olduğu bilinen ve her zaman yüksek düzey karbapenem direncine yol açmayan karbapenemaz tipleri göz önüne alındığında güvenilir sonuçlar elde etmek için rutinde ertapenem ve meropenem sonuçlarının birlikte değerlendirilmesi daha doğru bir yaklaşım olacaktır (11).

Karbapenemaz taraması tam otomatize duyarlılık sistemlerinden elde edilen MİK değerleri ile de yapılabilir. Ancak düşük düzey karbapenemaz üretiminde hatalı sonuçlar görülebildiğinden şüpheli izolatlarda sıvı mikrodilüsyon veya gradyent test ile MİK belirlenmesi veya disk difüzyon ile tarama testleri uygulanmalıdır (11).

2.8. KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ FENOTİPİK DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

Karbapenemaz taramasında eşik değerleri aşan veya klinik–epidemiyolojik açıdan şüpheli bulunan *Enterobacterales* izolatlarında, karbapenemaz üretiminin doğrulanması amacıyla fenotipik ve/veya genotipik yöntemlerin kullanılması önerilmektedir. Fenotipik doğrulama yöntemleri karbapenemaz enziminin fonksiyonel aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak ortaya koymaları nedeniyle rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında önemli bir yer tutmaktadır (11,56).

Fenotipik yaklaşımlar genel olarak; inhibitör temelli testler, karbapenem inaktivasyonuna dayalı yöntemler ve karbapenem hidrolizinin biyokimyasal veya kütle spektrometrisi ile gösterilmesine dayanan testler şeklinde sınıflandırılmaktadır. Bu yöntemlerin ortak amacı, tarama testleri ile saptanan şüpheli izolatlarda karbapenemaz aktivitesinin fonksiyonel olarak doğrulanmasıdır. Genel olarak fenotipik testler, düşük maliyetli olmaları, özel moleküler altyapı gerektirmemeleri ve kolay uygulanabilirlikleri nedeniyle özellikle kaynakları sınırlı laboratuvarlarda yaygın olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bazı karbapenemaz tiplerinde duyarlılığın sınırlı olması ve sonuçların yorumlanmasının deneyim gerektirmesi bu yöntemlerin temel kısıtlılıkları arasında yer almaktadır.

Fenotipik doğrulama yöntemlerinin tanısal performansı; karbapenemazın tipi, enzim ekspresyon düzeyi ve eşlik eden diğer direnç mekanizmalarından etkilenmektedir. Özellikle düşük hidroliz aktivitesine sahip OXA-48 benzeri karbapenemazlarda, bazı fenotipik testlerin yalancı negatif sonuçlar verebildiği bildirilmiştir. Bu nedenle fenotipik doğrulama testleri, tek başına mutlak tanı aracı olarak değil; tarama sonuçları, klinik bağlam ve gerektiğinde genotipik yöntemlerle birlikte değerlendirilmesi gereken tamamlayıcı yaklaşımlar olarak ele alınmalıdır.

Fenotipik doğrulama yöntemleri karbapenemaz üretiminin hızlı bir şekilde öngörülmesine katkı sağlayarak enfeksiyon kontrol önlemlerinin erken uygulanmasına ve uygun antimikrobiyal tedavi stratejilerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır. Ancak yöntemlerin sınırlılıkları göz önünde bulundurularak özellikle epidemiyolojik açıdan kritik izolatlarda moleküler doğrulama ile desteklenmesi önerilmektedir (12).

2.8.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Türevleri

Bakterinin ürettiği karbapenemaz enziminin, karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğini fonksiyonel olarak ortaya koymayı amaçlayan fenotipik doğrulama testleridir. Bu yaklaşımların temelinde, test izolatının karbapenem ile teması sonrasında antibiyotiğin etkinliğinde meydana gelen değişikliğin karbapeneme duyarlı bir gösterge/referans suş üzerinde oluşturduğu inhibisyon zonu üzerinden değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Karbapenemaz aktivitesinin varlığında antibiyotik kısmen veya tamamen inaktive olduğundan, gösterge/referans suşta oluşan inhibisyon zonu belirgin şekilde daralmakta ya da ortadan kalkmaktadır (57).

Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) ve modifiye türevleri olan mCIM ve EDTA ilaveli karbapenem inaktivasyon metodu (eCIM), farklı karbapenemaz sınıflarının fenotipik olarak saptanmasında yaygın şekilde kullanılan yöntemlerdir. Özellikle mCIM, Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü-CLSI) tarafından standardize edilmiş olup, klasik CIM'e kıyasla daha yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu bildirilmiştir. EDTA ilavesiyle uygulanan eCIM ise MBL 'lerin (NDM, VIM, IMP) serin karbapenemazlardan ayırt edilmesine olanak tanıyarak alt sınıf ayrımında katkı sağlamaktadır (58).

Bu yöntemler, özel ekipman gerektirmemeleri ve rutin laboratuvar koşullarında kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle pratik avantajlar sunmaktadır. Bununla birlikte, testlerin uzun inkübasyon süresi gerektirmesi ve düşük düzey karbapenemaz ekspresyonu gösteren izolatlarda hatalı negatif sonuç riski olması yöntemlerin başlıca sınırlılıklarıdır. Özellikle OXA-48 benzeri düşük hidroliz aktivitesine sahip enzimlerde, karbapenem inaktivasyonunun sınırlı düzeyde olması test performansını olumsuz etkileyebilmektedir (12).

2.8.2. Kombinasyon Disk Testi

Kombinasyon disk testleri (KDT), karbapenemaz üretiminin saptanmasının yanında karbapenemaz tipinin de fenotipik olarak değerlendirilmesinde sık başvurulan yöntemlerden biridir. Bu testlerde, karbapenemaza özgül inhibitörler (örn. boronik asit türevleri, EDTA) eklenmiş diskler kullanılmaktadır. Hedef enzime özgül inhibitörün varlığında karbapenem diskinin inhibisyon zonundaki artış ilgili karbapenemaz sınıfının varlığına işaret etmektedir. EDTA veya DPA inhibitörleri MBL'ların (NDM, VIM, IMP), PBA ise KPC tipi karbapenemazların belirlenmesinde kullanılmaktadır. Özellikle KPC tipi serin karbapenemazlar ile MBL arasında ayrım yapılabilmesini sağlayabilmeleri yanında maliyeti düşük, kolaylıkla uygulanabilen ve özel ekipman gerektirmeyen yöntem olmaları bu testlerin klinikteki önemini artırmaktadır. Ancak, düşük hidroliz aktivitesi gösteren OXA-48 benzeri karbapenemazlar için henüz rutinde kullanılabilecek özgül bir inhibitör bulunmaması nedeniyle kombinasyon disk testleri sınırlı duyarlılığa sahiptir. Bu durum hatalı negatif sonuçlara yol açabildiğinden tek başına yöntemin tanısal yeterliliğini azaltmaktadır. Bu nedenle yöntemin özellikle

OXA-48'in endemik olduğu bölgelerde diğer fenotipik (örn. CIM/mCIM) veya genotipik yöntemlerle desteklenmesi gerekmektedir (59).

2.8.3. Biyokimyasal (Kolorimetrik) Testler

Karbapenemaz enziminin karbapenemi hidroliz etmesi sonucu oluşan pH değişikliğinin, testte kullanılan indikatörlerin renk değiştirmesine neden olarak görünür hale gelmesi prensibine dayanan hızlı fenotipik yöntemlerdir. Carba NP, Blue-Carba, β-CARBA ve ticari formatları olan Rapidec Carba NP veya CARBA-5 gibi testler bu grupta yer alan sık kullanılan kolorimetrik yöntemlerdendir. Genellikle yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olan testler özel ekipman gerektirmemeleri, kolay uygulanabilir olmaları ve kısa sürede (<2 saat) sonuç vermeleri nedeniyle tercih edilmektedir. Ancak özellikle OXA-48 benzeri düşük hidroliz kapasiteli karbapenemazlarda duyarlılıklarının düşük olması nedeniyle klinik veya epidemiyolojik şüphe durumunda sonuçların ek bir fenotipik test veya moleküler yöntemle doğrulanması önerilmektedir (55).

2.8.4. Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS, lazerle iyonize edilen moleküllerin uçuş paterninin analizine dayanarak mikroorganizmaların tanımlanmasında kullanılan oldukça hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Günümüzde identifikasyonun yanı sıra antibiyotik duyarlılık testleri ve antibiyotik direnç paternlerinin saptanmasında da kullanılabilmektedir. Karbapenem hidrolizi, test edilecek izolatın, karbapenem ile 35±1 °C 'de 2-4 saat inkübasyonu sonrasında santrifüj edilerek hazırlanan süpernatantının kütle spektrofotometrisi ile ölçülmesiyle belirlenmektedir. Karbapenemaz varlığında antibiyotiğin hidrolize uğramasıyla oluşan son ürünlerin neden olduğu değişiklikler kütle spektrumunda ayırt edilebilmektedir. Elde edilen spektrumlar, antibiyotiğin hidrolize olup olmadığını ortaya koyarak karbapenemaz üretiminin 2–3 saat içinde değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Oldukça hızlı sonuç verme potansiyeli ve yüksek duyarlılık-özgüllüğe sahip olması ile dikkat çekmekle birlikte güvenilir sonuçların elde edilebilmesi için cihaz parametrelerinin optimize edilmesi ve işlemin deneyimli personel tarafından yürütülmesi gerekmektedir (60).

2.8.5. Lateral Akım Yöntemleri (İmmunokromatografik testler)

Lateral akım (immünokromatografik) testler, karbapenemaz enzimlerini özgül monoklonal antikorlar aracılığıyla doğrudan saptamaya yönelik hızlı fenotipik doğrulama yöntemleridir. Klinik pratikte yaygın olarak kullanılan testler arasında NG-Test CARBA 5, RESIST-5 O.O.K.N.V. ve CARBA-5 gibi ticari kitler yer almaktadır. Bu testler, kısa sürede sonuç vermeleri ve uygulama kolaylıkları nedeniyle özellikle hızlı karar verilmesi gereken durumlarda avantaj sağlamaktadır. Bununla birlikte belirli ve sınırlı sayıda karbapenemaz tipinin belirlenebilmesi, panel dışında kalan nadir veya bölgesel olarak farklı karbapenemaz tiplerinin saptanamaması ve düşük enzim ekspresyonu gösteren izolatlarda yalancı negatif sonuçların görülebilmesi yöntemin temel kısıtlılıklarıdır. Bu nedenle elde edilen sonuçların klinik ve epidemiyolojik açıdan değerlendirilmesi ve gerekli durumlarda moleküler yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir (61).

2.8.6. Diğer Yöntemler

Kültür bazlı tarama, karbapenemaz üreten bakterilerin kolonizasyonunun tespitinde enfeksiyon kontrolü ve sürveyans için temel yaklaşımdır. Klinik örneklerin kromojenik besiyerlerine (chromID® CARBA, CHROMagar™ mSuperCARBA™ gibi) ekilmesi dirençli izolatların renkli koloniler oluşturmalarıyla duyarlı izolatlardan kolaylıkla hızlı ve seçici izolasyonunu sağladığından yaygın kullanılmaktadır (62). Geleneksel kültür yöntemleri arasında ise uygulaması kolay ve maliyet-etkin ancak standardizasyon ve yorumlama deneyimi gerektiren yüksek duyarlılığa sahip sıvı zenginleştirme (CDC) yöntemi ve daha hızlı taramaya olanak veren direkt karbapenem disk yöntemi yer almaktadır (63,64).

Günümüzde otomatize sistemler de örneğin BD Phoenix™ CPO Detect paneli, rutin duyarlılık testi ile birlikte karbapenemaz aktivitesini saptayarak Ambler sınıfına göre sınıflandırabilmektedir. Bu tür sistemler, tarama ile sınıf doğrulamasını aynı platformda birleştirerek laboratuvar iş akışını hızlandırmakta, sonuçların standardizasyonunu artırmakta ve karbapenemaz üretiminin erken öngörülmesine olanak sağlamaktadır. Ancak bu yaklaşımlar, fenotipik tarama yöntemleri kapsamında değerlendirilmekte olup, elde edilen sonuçların klinik ve epidemiyolojik açıdan

yorumlanması yanında gerekli durumlarda genotipik doğrulama yöntemleriyle desteklenmesi önerilmektedir (65).

2.9. KARBAPENEMAZ ÜRETİMİ GENOTİPİK DOĞRULAMA YÖNTEMLERİ

Genotipik doğrulama yöntemleri, karbapenem direnç genlerinin doğrudan saptanmasına dayanan, yüksek duyarlılık ve özgüllük sunan moleküler yaklaşımlar olup karbapenemaz üretiminin kesin olarak ortaya konulmasında altın standart olarak kabul edilmektedir. Bu yöntemler, özellikle düşük düzey enzim ekspresyonu gösteren veya fenotipik yöntemlerle saptanması güç olan karbapenemazların belirlenmesinde önemli avantajlar sağlamaktadır. Fenotipik testlerle elde edilen şüpheli ya da belirsiz sonuçların doğrulanmasında ve epidemiyolojik değerlendirmelerde değerli bir role sahip olmakla birlikte, yüksek maliyet, ileri teknik altyapı gereksinimi ve her laboratuvarda rutin olarak uygulanamaması gibi nedenlerle genellikle fenotipik yöntemleri tamamlayıcı nitelikte kullanılmaktadır. Bu nedenle genotipik testlerin, tanısal yaklaşımlarda fenotipik bulgular ve klinik–epidemiyolojik verilerle birlikte bütüncül olarak değerlendirilmesi önerilmektedir (66,67).

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında en yaygın kullanılan genotipik yaklaşım gerçek zamanlı ve multipleks PZR olup, birden fazla karbapenem direnç geninin eş zamanlı olarak saptanmasına olanak tanımaktadır. Bunun yanı sıra döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) gibi hızlı moleküler yöntemler ile dizileme teknikleri (Sanger dizileme ve tüm genom dizileme) daha ileri düzey moleküler karakterizasyon ve sürveyans amacıyla kullanılabilmektedir (68).

Tablo 3. Karbapenemaz doğrulama yöntemleri avantaj ve dezavantajları

Yöntem	Türü	Örnek Özelliği	Avantajları	Dezavantajları
mCIM/CIM / Türevleri	Fenotipik	Kültür	Uygun maliyetli, pratik	Süre uzun, Bazı türevlerde duyarlılık düşük
Kombinasyon disk testi	Fenotipik	Kültür	Sınıf düzeyinde fenotipik ayrım	İnhibitör seçimine bağlı sonuçlar değişebilir
CARBA NP testi ve türevleri	Fenotipik	Kültür	Hızlı sonuç	Bazı türevlerde yalancı negative sonuç
İmmunokromatografik test (Lateral flow testler)	Fenotipik	Kültür	Basit ve hızlı	Pahalı, sınırlı tip tanımı
MALDI-TOF MS	Fenotipik	Kültür	Hızlı ve özgül sonuç	Cihaz ve uzmanlık gerektirir
Kültür bazlı yöntemler	Fenotipik	Kültür	Rutin kullanıma uygun	Süre uzun, tip ayrımı yapamaz
Polimeraz zincir reaksiyonu	Genotipik	DNA	Hassas ve özgül	Cihaz ve uzmanlık gerektirir

3.GEREÇ-YÖNTEM

Uluslararası etik kurallara uygun olarak yapılmış olan bu çalışma için Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 22.01.2025 tarihli 2025-02-15 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır (Bkz. EK 1). Prospektif ve tanımlayıcı bir çalışma olarak planlanan çalışma Bakırköy Dr. Sadi Konuk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında olmak üzere tek merkezde yapılmıştır.

3.1. ÇALIŞMA İZOLATLARININ SEÇİMİ VE İŞ AKIŞI

01.01.2021-01.06.2025 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, tanımlamaları ve antibiyogram duyarlılıkları VITEK® 2 Compact (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) otomatize sistemi ile belirlenen ve izolasyon sonrası -80°C'de saklanan *E. coli* izolatları retrospektif olarak değerlendirilmiştir. Hasta örnekleri değerlendirilirken yaş ve cinsiyet farkı gözetmeksizin, tüm servis ve polikliniklerden gelen örneklerin kültürlerinden izole edilen *E. coli* izolatları incelenmiştir. Aynı hastaya ait tekrarlayan izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları, izolatların ilk izolasyon tarihindeki raporlanan sonuçları esas alınarak değerlendirilmiştir.

Çalışma izolatları; EUCAST 2017 rehberinde tanımlanan karbapenemaz tarama kriterleri doğrultusunda stoklanmış *E. coli* izolatları arasından meropenem ve/veya ertapenem MİK >0.125 mg/L olan izolatlar karbapenemaz üretimi açısından şüpheli kabul edilerek seçilmiştir (11). Seçilen izolatlara karbapenemaz üretiminin saptanmasında tarama kriteri olarak önerilen meropenem (10 µg) ve ertapenem (10 µg) (Oxoid, Birleşik Krallık) disk difüzyon testi uygulanmıştır (11). İnkübasyon süresi sonunda oluşan inhibisyon zon çapları milimetre cinsinden ölçülerek kaydedilmiştir. Elde edilen zon çapları, EUCAST 2017 tarafından önerilen karbapenemaz tarama testi eşik değerleri esas alınarak değerlendirilmiştir. (Tablo 4) Buna göre ertapenem için zon çapı <25, meropenem için zon çapı <25 mm bulunan ve meropenem 25-27 mm zon çapı olup piperasilin tazobaktam dirençli olarak saptanan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir.

Tablo 4. EUCAST önerilerine göre karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için Meropenem ve Ertapenem klinik sınır ve tarama eşik değerleri

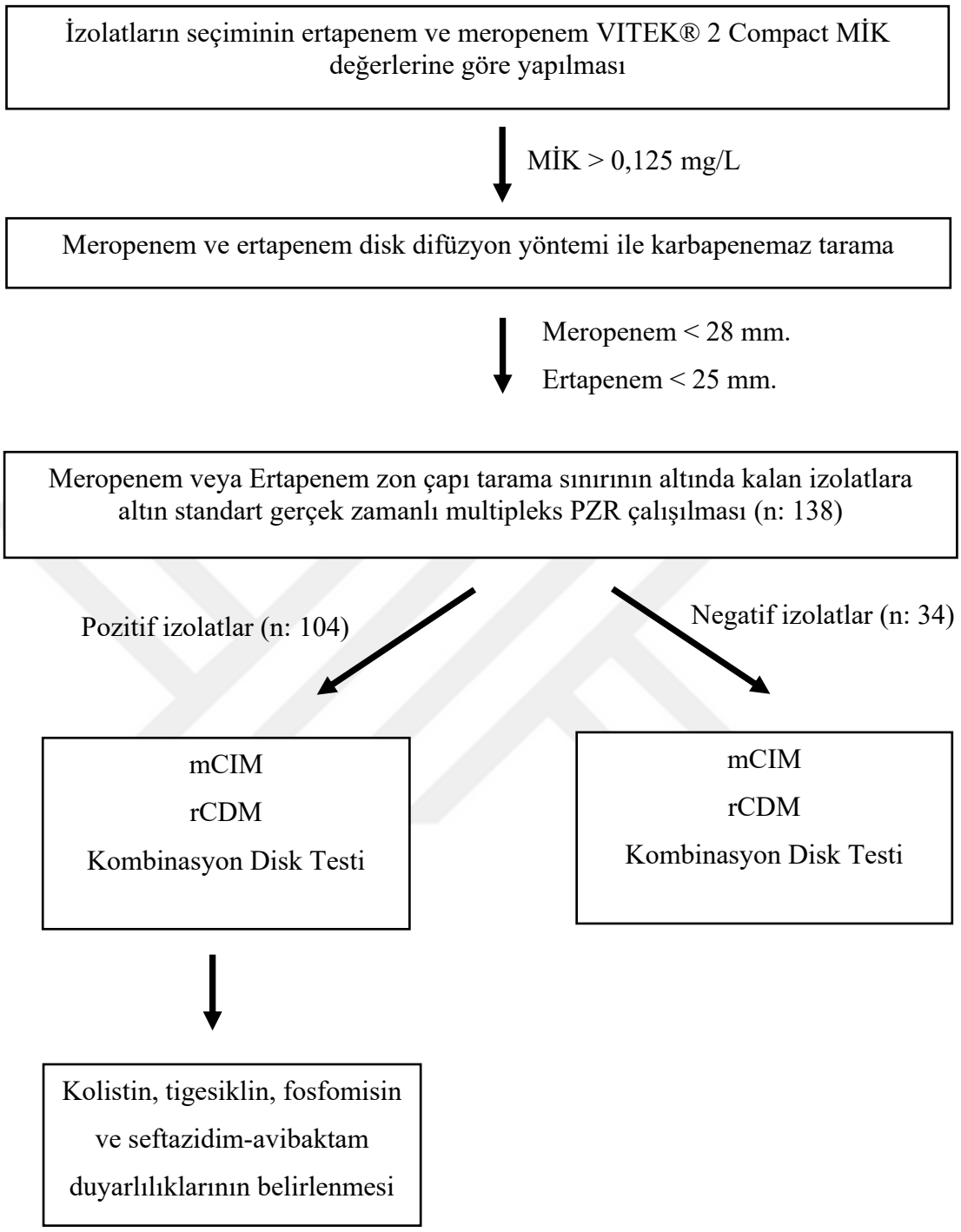
Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zon çapı (mm)	
	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem*	≤ 2	> 0,125	≥ 22	< 28**
Ertapenem***	≤ 0.5	> 0,125	≥ 25	< 25

* Duyarlılık ve özgüllüğün en dengede olduğu karbapenemdir.

** <25 mm ise daima, 25-27 mm ise piperasilin-tazobaktam veya temosilin dirençli ise karbapenemaz araştırılmalıdır.

*** Duyarlılık yüksek, özgüllük düşüktür.

Çalışmaya dahil edilen toplam 138 *E. coli* izolatı %5 koyun kanlı agar besiyerine (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, UK) ekilerek 35 ± 1°C'de 16-20 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar tek koloni ekimi yapılıp saf kültür olarak üretilerek çalışmaya dahil edilmiş olup, tamamında karbapenemaz üretimi altın standart (referans) genotipik yöntem olan gerçek zamanlı multıpleks PZR ile araştırılmıştır. Fenotipik doğrulama amacıyla tüm izolatlara uygulanan mCIM ve rCDM testlerinin tanısal performansları, özgüllük ve duyarlılık değerleri, PZR sonuçlarına göre değerlendirilerek hesaplanmıştır. Ek olarak tüm izolatlara karbapenemaz üretiminin saptanabilmesi ve karbapenemaz pozitif izolatlarda fenotipik tiplendirme yapılabilmesi amacıyla kombinasyon disk testi uygulanmıştır. Ayrıca karbapenemaz pozitif olarak saptanan izolatların tedavi seçenekleri arasında yer alan kolistin, tigesiklin, fosfomisin ve seftazidim-avibaktam antibiyotik duyarlılıkları çalışılmıştır. Gereç ve yöntem için iş akış şıralaması aşağıda özetlenmiştir.



Şekil 2. Gereç-yöntem için iş akış şeması

3.2. GENOTİPİK YÖNTEMLE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Çalışmamıza dahil edilen tüm izolatlarda en sık görülen KPC, NDM, VIM, IMP ve OXA-48 karbapenem direnç genlerinin varlığı ticari qPCR kiti (Bioseksen, Türkiye) kullanılarak gerçek zamanlı multipleks PZR yöntemi ile çalışılmıştır.

3.2.1. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu Zybio EXM3000 cihazı ile uyumlu olan manyetik boncuk temelli saflaştırma prensibine dayanan Biospeedy Hızlı Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Biospeedy Bioseksen, Türkiye) kullanılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu amacıyla %5 koyun kanlı agara (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, UK) ekilerek 35 ± 1 °C'de 16-20 saat inkübe edildikten sonra üretilen saf *E. coli* kolonileri kullanılmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda uygulanan işlem basamakları sırasıyla;

- Bakteri süspansiyonu hazırlamak için;

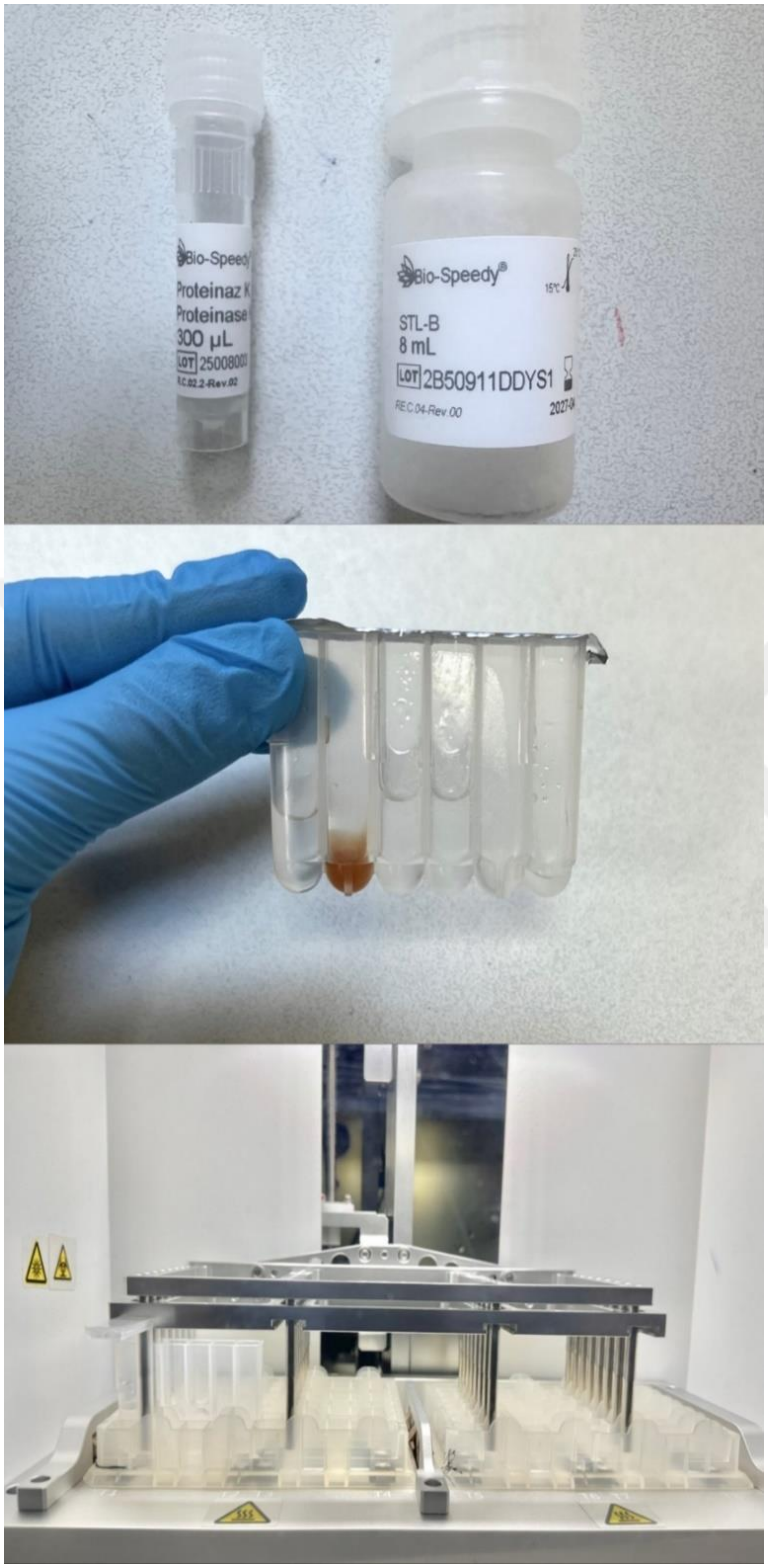
1. 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüplerine kit içeriğinde yer alan 200 µL STL-B çözeltisi eklenmiştir.
1. Ardından taze kültürden koloni büyüklüğüne bağlı olarak 1–3 adet alınarak bu çözelti içerisinde dikkatlice süspanse edilmiştir.
2. Homojenizasyon amacıyla maksimum hızda 30 saniye vortekslenmiştir.
3. Elde edilen bakteri süspansiyonu, kit kartuşlarında ilgili kuyucuklara aktarılmak üzere hazırlanmıştır.

Her bir izolat için hazırlanan kartuşların üzerine ilgili izolat numaraları kaydedilmiştir. Kesik köşesi sol altta kalacak şekilde düz bir zemine yerleştirilen en fazla sekiz kartuş alacak şekilde düzenlenmiş kartuş standındaki uygun yuvalara oturtulmuştur. Standa yerleştirilmeden önce sertçe silkelenerek çözeltilerin kuyucukların dibinde toplanması sağlanmış ve üzerindeki folyo kapaklar dikkatlice açılmıştır.

- Ekstraksiyon işlemi için;

1. Hazırlanan kartuşların ilk kuyucuklarına 15 µL Proteinaz K pipetlenmiştir.
2. Ardından aynı kuyucuklara hazırlanan 200 µL bakteri süspansiyonu pipetlenmiştir.

3. Kartuş standı EXM3000 cihazına yerleştirilmiş, manyetik çubuk kılıfları cihazdaki uygun pozisyonlara takılmıştır.
4. Menü üzerinden ‘Run’ seçeneği ile ZYBIO-B-200 programı başlatılmış, ardından ekranda beliren ‘Prompt’ ve ‘Confirm’ adımları onaylanarak yaklaşık 10 dakika süren ekstraksiyon işlemi otomatik olarak gerçekleştirilmiştir.
5. Kartuşun son kuyucuğunda toplanan yaklaşık 80–100 µL ekstrakte edilen DNA örneği 1,5 mL’lik nükleaz içermeyen mikrosantrifüj tüplerine dikkatlice pipetlenerek qPCR analizlerinde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir.



Ekstraksiyon işlemi sırasında kullanılan STL-B ve Proteinaz K

Ekstraksiyon işleminin gerçekleştiği plastik kartuş

Zybio EXM3000 Ekstraksiyon cihazı iç görünümü

Şekil 3. Hızlı nükleik asit ekstraksiyon kiti işlem basamakları

3.2.2. Gerçek Zamanlı Multipleks PZR Çalışılması

Çalışmada gerçek zamanlı PZR uygulamaları, üretici firmanın önerileri doğrultusunda yürütülmüştür. PZR reaksiyonu öncesi Magnetic Induction Cycler (Mic) cihazına kit prospektüsünde tanımlanan qPCR programı kurularak amplifikasyon işlemleri bu program doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (Şekil 4). qPCR programına ait basamaklar, sıcaklık ve süre parametreleri Tablo 5'de gösterilmiştir.

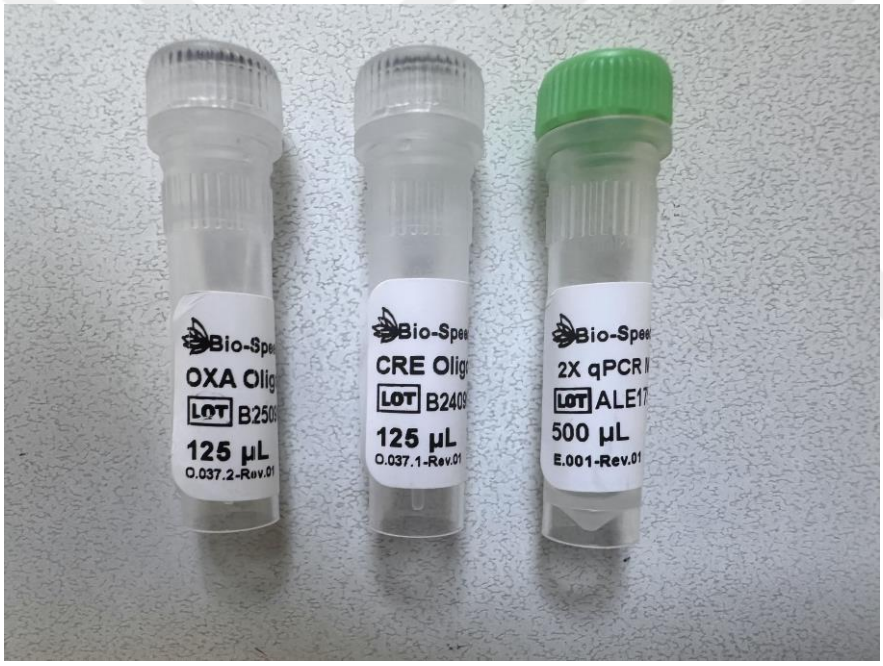
Tablo 5. Karbapenem direnç geni saptanmasında uygulanan qPCR Programı işlem basamakları

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim aktivasyonu	1 döngü	52°C	3 dk
Bekleme	1döngü	95°C	10 sn
Denatürasyon	12 touchdown döngüsü*	95°C	1 sn
Bağlanma/uzama		67°C-56°C	15 sn
Denatürasyon	30 döngü	95°C	1 sn
Bağlanma/uzaman		55°C	15 sn
Tespit(okuma)		FAM (Yeşil) /HEX (Sarı) ROX (Turuncu)/CY5 (Kırmızı)	
*Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma			



Şekil 4. 48 örnek kapasiteli MIC qPCR cihazı

PZR analizleri öncesinde, tüm reaktifler −20 °C saklama koşullarından oda sıcaklığına getirilerek üretici firma talimatlarına uygun şekilde çözdürülmüştür. Çalışmada; KPC, NDM, VIM, IMP karbapenem direnç genlerinin tespitine yönelik CRE Oligo miksi, OXA-48, OXA-51, OXA-23/OXA-58 genlerinin ve internal kontrolün tespitine yönelik olarak ise OXA Oligo miksi olmak üzere iki ayrı master miks (reaksiyon karışımı) kullanılmıştır (Şekil 5). PZR reaksiyonunda kullanılmak üzere iki ayrı mikrosantrifüj tüpüne her bir izolat için 5 µL olacak şekilde birine CRE Oligo Mix ve diğerine OXA Oligo Mix pipetlenmiş; ardından her iki tüpe de 10 µL olacak şekilde 2X qPCR Mix eklenerek master miksler hazırlanmıştır. Pipetleme sırasında oluşabilecek hacim kayıplarını önlemek amacıyla planlanan reaksiyon sayısına ek olarak üç reaksiyonluk fazla hacim eklenerek hesaplama yapılmıştır.



Şekil 5. PZR reaksiyonu için kullanılan OXA, CRE ve qPCR Oligomiksleri

PZR reaksiyonunda her bir izolat için iki ayrı kuyucuk kullanılmıştır. İlk kuyucuğa hazırlanan CRE master miksten 15 µL ve ikinci kuyucuğa hazırlanan OXA master miksten 15 µL dağıtılmıştır. Her iki kuyucuğun üzerlerine ekstrakte edilen DNA örneğinden 5 µL eklenerek toplam reaksiyon hacmi 20 µL olacak şekilde hazırlanmıştır. Reaksiyon karışım bileşenleri ve reaksiyon hacimleri Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 6. qPCR için reaksiyon karışımı bileşenleri ve hedef genler

İçerik	Kullanım Amacı	Florofor / Hedef Genler	Tek Reaksiyon Hacmi (µL)
2X qPCR Mix	PCR tepkimesi için optimize edilmiş hazır mix	-	10
CRE Oligo Mix	KPC, NDM, VIM, IMP genlerinin amplifikasyonu	FAM (KPC) HEX (NDM) ROX (VIM) Cy5 (IMP)	5
OXA Oligo Mix	OXA-48, OXA-51, OXA-23/OXA-58 IC tespiti	FAM (OXA-51) Cy5 (OXA-48) ROX (OXA-23/OXA-58) HEX (IC)	
Ekstraksiyon ürünü	Hedef Nükleik Asit	-	5
NTC	Negatif Kontrol	-	
PC-Mix	Pozitif Kontrol	-	
Toplam reaksiyon hacmi			20

Pipetleme işlemlerinin tamamlanmasının ardından kuyucuklar cihaza yerleştirilmiş ve önceden cihaza tanımlanan qPCR programı kullanılarak amplifikasyon süreci başlatılmıştır. Kit içeriğinde yer alan negatif kontrol (NTC) ve pozitif kontrol (PC miks), üretici firmanın önerileri doğrultusunda reaksiyonlara dahil edilmiştir. Buna ek olarak, yöntemin hedef genleri doğru ve özgül biçimde tanımladığını doğrulamak amacıyla VIM, OXA-48, KPC, NDM ve IMP gen bölgeleri açısından bilinen izolatlara ait DNA örnekleri reaksiyonlarla birlikte çalışılmıştır.

3.2.3. Gerçek Zamanlı Multipleks PZR Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Gerçek zamanlı PZR tamamlandıktan sonra elde edilen veriler, üretici firmanın değerlendirme kriterleri esas alınarak analiz edilmiştir. Öncelikle pozitif kontrol, negatif kontrol sonuçları üzerinden testin geçerliliği değerlendirilmiş; negatif kontrolde hedef genlere ait amplifikasyon sinyali gözlenmemesi ve pozitif kontrolde karakteristik sigmoid amplifikasyon eğrilerinin üretici tarafından tanımlanan eşik değerler içinde izlenmesi ($Cq \leq 26$) geçerlilik kriteri olarak kabul edilmiştir. Bu

koşullar sağlandıktan sonra sigmoid amplifikasyon eğrisi gösteren üretici firma değerlendirme eşik değerlerine göre Cq değeri ≤ 26 ve RFU değeri ≥0.5 bulunan örnekler pozitif, bu ölçütleri karşılamayan veya amplifikasyon eğrisi göstermeyen örnekler negatif olarak değerlendirilmiştir.

PZR sonuçlarının analizi, eş zamanlı olarak cihaz yazılımı üzerinden ve manuel sigmoidal eğrilerin değerlendirmesi ile yapılmıştır. Üretici firmanın sağladığı Sigmoida yazılımı (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak elde edilen veriler ile manuel değerlendirme sonuçları arasında uyum olduğu görülmüştür. Çalışmada kit içeriğinde yer alan karbapenem direnç genleri (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$ *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-48}$) hedeflerine yönelik pozitif sinyal saptanan örnekler genotipik olarak sınıflandırılarak moleküler düzeyde raporlanmıştır.

3.3. Fenotipik Yöntemlerle Karbapenemaz Üretiminin Araştırılması

Çalışma grubuna dahil edilen gerçek zamanlı multipleks PZR analizleri ile karbapenemaz pozitif ve negatif olarak saptanan tüm izolatlara fenotipik karbapenemaz doğrulama yöntemleri olan mCIM ve rCDM uygulanmıştır. Ayrıca karbapenemaz üretimi yanında karbapenemaz tiplerinin de fenotipik olarak ayrımını değerlendirmek üzere KDT uygulanmıştır.

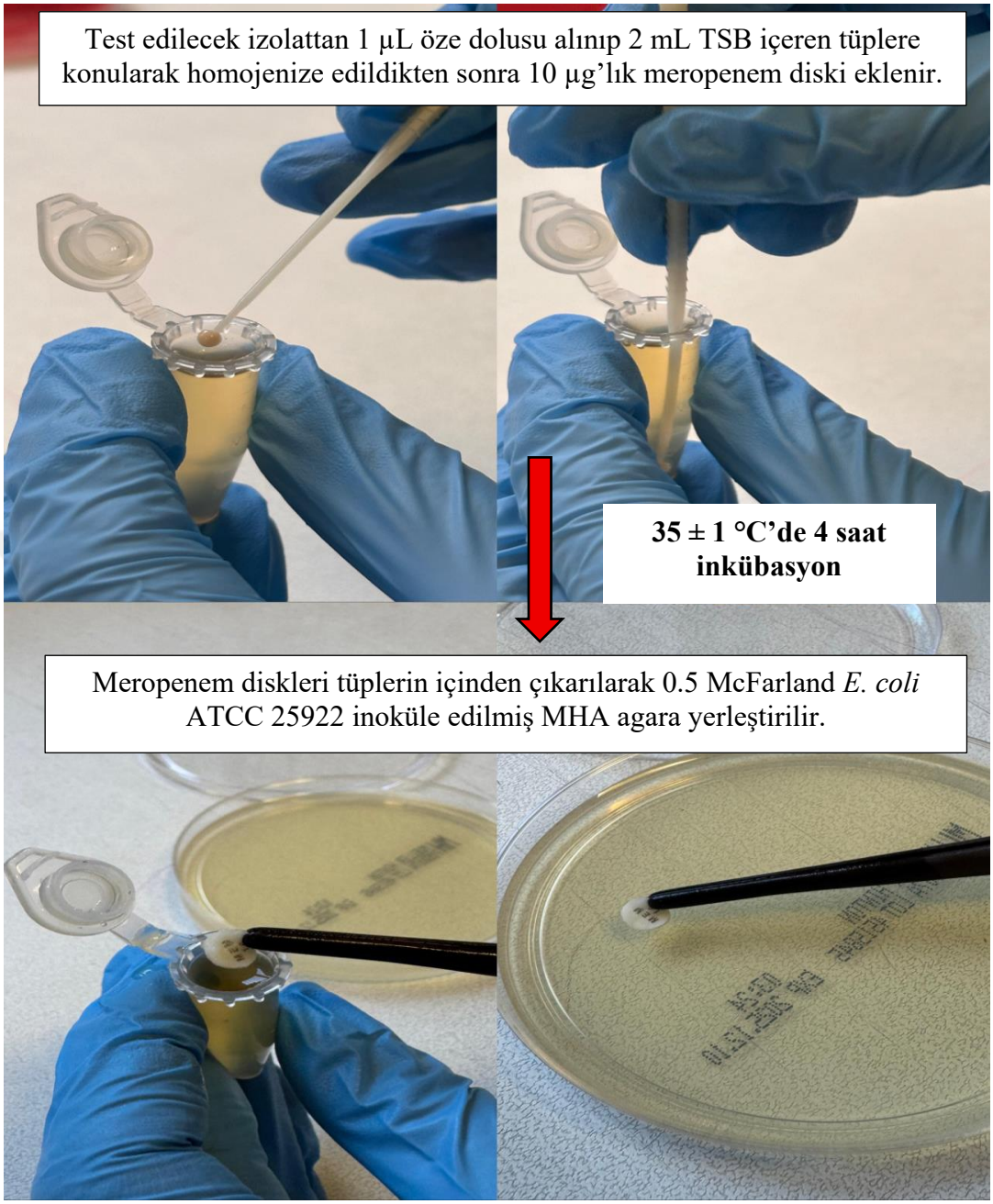
Fenotipik testlerden mCIM ve rCDM'nin kalite kontrolünde *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (karbapenemaz pozitif) ve *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (karbapenemaz negatif) standart suşları kullanılmıştır. Karbapenemaz tip tayinine yönelik fenotipik testlerin kalite kontrol sürecinde ek olarak OXA-48, NDM, VİM, KPC ve IMP karbapenem direnç genlerinin pozitif olduğu bilinen izolatlar kullanılmıştır.

3.3.1. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM)

Karbapenemaz üretiminin fenotipik doğrulanması amacıyla çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara CLSI M100 (2025) kılavuzuna uygun olarak mCIM testi uygulanmıştır (69). Her bir izolatın %5 koyun kanlı agara ekilip 18–24 saat inkübasyonu sonrası üretilen taze kolonilerinden 1 µL öze dolusu alınarak 2 mL Triptik Soy Buyyon (TSB) (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Birleşik Krallık)

içeren tüplere aktarılmış, vortekslenerek homojenize edilmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonları içine 10 µg meropenem diski tamamı süspansiyonun içine daldırılacak şekilde (Oxoid, Birleşik Krallık) eklenerek 35 ± 1 °C'de 4 saat ± 15 dakika inkübe edilmiştir.

Meropenem diskinin inkübasyonun tamamlanmasına yakın (en fazla 15 dakika kala), Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak 0.5 McFarland standardında hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu Müeller-Hinton Agar (MHA) plaklarına EUCAST Disk Difüzyon Yöntemi (Versiyon 13.0, 2025) esaslarına göre inoküle edilerek hazırlanmıştır (70). İnkübasyonu tamamlanan meropenem diskleri penset yardımıyla TSB içerisinden çıkarılarak fazla sıvısı uzaklaştırıldıktan sonra *E. coli* ATCC 25922 inoküle edilmiş MHA yüzeyine yerleştirilmiştir (Şekil 6). Tüm işlem başamaklarının maksimum 15 dakika içinde tamamlanması sağlanarak hazırlanan MHA besiyerleri 35 ± 1 °C'de normal atmosfer koşullarında 18–24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçülüp kaydedilerek mCIM sonuçları değerlendirilmiştir (69).



Şekil 6. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) uygulama basamakları

CLSI kriterlerine göre, meropenem diski çevresinde 6–15 mm arasında inhibisyon zonu saptanan izolatlar karbapenemaz pozitif olarak kabul edilmiştir. İnhibisyon zon çapının 16–18 mm aralığında olduğu durumlarda, zon içerisinde tekli (pinpoint) koloni üremesinin varlığı halinde sonuç karbapenemaz pozitif olarak değerlendirilmiştir. Meropenem diski çevresinde ≥19 mm inhibisyon zonu saptanan izolatlar karbapenemaz negatif olarak kabul edilmiştir. Ancak, 16–18 mm zon çapına

sahip olup zon içerisinde koloni üremesi izlenmeyen izolatlar ile ≥19 mm zon çapına sahip olmasına rağmen inhibisyon zonu içerisinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler gözlenen izolatlar karbapenemaz üretimi açısından belirsiz olarak değerlendirilmiştir. Belirsiz sonuç elde edilen izolatlarda test tekrarı uygulanmıştır. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) değerlendirme kriterleri Tablo 7'de özetlenmiştir.

Tablo 7. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) Değerlendirme Kriterleri

Karbapenemaz üretimi	Meropenem zon çapı
Pozitif	<15 mm veya 16-18 mm ve inhibisyon zon içi tekli üreme
Negatif	>19 mm
Belirsiz	16-18 mm veya >19 mm ve inhibisyon zon içi tekli üreme

3.3.2. Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu (rCDM)

Karbapenemaz üretiminin kısa sürede ve düşük maliyetle fenotipik olarak saptanmasına olanak sağlayan bir yöntem olan rCDM, Jing ve arkadaşları tarafından 2019 yılında tanımlanmıştır. Bu çalışmada rCDM testi, tanımlanan prosedürlere sadık kalınarak uygulanmıştır (71).

rCDM İçin Uygun Besiyeri Hazırlanması

Testin uygulanmasında kullanılacak MHA besiyeri ticari MHA tozu (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, UK) kullanılarak üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Bu amaçla 38 g MHA tozu, 1000 mL saf distile su içerisinde çözündürülerek homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Hazırlanan besiyeri 1 atmosfer ek basınç altında (atmosfer basıncıyla birlikte ≈2 atmosfer mutlak basınçta), 121 °C'de 15 dakika süreyle otoklavda sterilize edilmiş ve ardından 50–55 °C sıcaklık aralığına kadar soğutulmuştur. Sterilize edilen besiyeri, rCDM yönteminin temel gerekliliklerinden biri olan 3 mm. agar derinliği sağlanacak şekilde steril petri kaplarına dökülmüştür. Bu kalınlık, antibiyotiğin difüzyon hızını ve dolayısıyla inhibisyon zonlarının güvenilir biçimde ölçülmesini doğrudan etkilediğinden

yöntemin standardizasyonu açısından kritik kabul edilmiştir. Döküm sırasında her bir 90 mm. çapındaki petri kabına 15–16 mL agar dağıtılarak hedeflenen besiyeri kalınlığı sağlanmıştır. Hazırlanan plakların oda sıcaklığında katılaşmasını bekledikten sonra yüzeyindeki fazla nemin uzaklaştırılması için 35 °C'de 15 dakika kapakları aralanarak inkübasyonu sağlanmış, takiben ters çevrilmiş şekilde ışık almayan koşullarda +4 °C'de kullanım zamanına kadar muhafaza edilmiştir. Dökülen besiyerlerinin %1-5'i alınıp 35 ± 1 °C'de 48 saat inkübe edilerek kontaminasyon kontrolü, aynı zamanda *E. coli* ATCC 25922 ile antibiyotik duyarlılık testi çalışılarak iç kalite kontrolü yapılmıştır. rCDM için besiyerlerinin hazırlanmasında uygulama basamakları Şekil 7'de gösterilmiştir.

rCDM Uygulanması ve Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara Jing ve arkadaşları tarafından tanımlanan protokol esas alınarak rCDM fenotipik doğrulama testi uygulanmıştır (71). Testte 3 mm. derinliğine sahip MHA besiyerleri kullanılmıştır. Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak 3 McFarland standardında hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu steril pamuk uçlu eküvyon yardımıyla MHA yüzeyine inoküle edilmiştir. Test edilecek izolatların tek koloni ekimi sonrası üreyen taze pasajlarından steril öze yardımıyla alınan koloniler 10 µg imipenem disklerinin tüm yüzeyini ince ve homojen bir tabaka halinde kaplayacak şekilde sürülmüştür. Bakteri ile kaplanan imipenem diskleri daha önce *E. coli* ATCC 25922 yayılan MHA yüzeyine bakteri inoküle edilen yüzeyi besiyerine gelecek şekilde yerleştirilmiştir. Her bir plakta, ayrı test izolatı ile kaplanmış üç adet imipenem diski ile zon çapı kontrolü için bakteri sürülmemiş bir adet imipenem diski birlikte yer almıştır. Tüm işlem başamaklarının maksimum 15'er dakika içinde tamamlanması sağlanarak hazırlanan MHA besiyerleri 35 ± 1 °C'de normal atmosfer koşullarında 5-6 saat inkübe edilmiştir (Şekil 8). İnkübasyon sonunda beşinci ve altıncı saatlerdeki inhibisyon zon çapları ölçülüp kaydedilerek rCDM sonuçları değerlendirilmiştir.

Test metodunun değerlendirilmesinde inkübasyonun beşinci ve altıncı saatlerinde bakteri sürülmemiş disk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapı ile test izolatı ile kaplanan disklerin zon çapları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Bakteri sürülmemiş kontrol diski ile test diski arasındaki zon çapı farkının ≥5 mm olması karbapenemaz üretimi lehine değerlendirilmiştir. Zon farkının <3 mm olduğu durumlar karbapenemaz üretimi açısından negatif olarak kabul edilmiştir. Zon çapı farkının 3–5 mm aralığında saptandığı izolatlar belirsiz sonuç olarak değerlendirilmiş ve test tekrarlanmıştır. rCDM değerlendirme kriterleri Tablo 8'de gösterilmiştir.



Şekil 7.Hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM) için besiyerlerinin hazırlanması



Şekil 8. Hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM) uygulama basamakları

Tablo 8. Hızlı Karbapenemaz Tespit metodu (rCDM) Değerlendirme Kriterleri

Karbapenemaz üretimi	Değerlendirme kriteri
Pozitif	Kontrol zon çapı-test edilen mikroorganizma zon çapı ≥5 mm
Negatif	Kontrol zon çapı-test edilen mikroorganizma zon çapı <3mm
Belirsiz	Kontrol zon çapı-test edilen mikroorganizma zon çapı 3-5 mm arasında

3.3.3. Kombinasyon Disk Testi

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara karbapenemaz üretiminin saptanabilmesi ve karbapenemaz tiplerinin fenotipik olarak ayrımının yapabilmesi amacıyla ticari olarak temin edilen Liofilchem® KPC&MBL&OXA-48 Disk Kiti (Ref: 99007, Liofilchem S.r.l., İtalya) KDT uygulanmıştır. Testin uygulanması ve değerlendirilmesi, üretici firmanın kılavuzunda belirtilen talimatlar ve EUCAST yönergeleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Test edilecek izolatların tek koloni ekim ile üretilen taze pasajlarından Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak 0.5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonları klasik disk difüzyon yöntemi ile MHA (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Birleşik Krallık) besiyerine inoküle edilmiştir. İnokülasyonu takiben en geç 15 dakika içerisinde kit içeriğinde yer alan diskler steril penset yardımıyla besiyeri yüzeyine yerleştirilmiştir. Diskler arasında merkezden merkeze en az 25 mm mesafe bırakılmış, disklerin petri kabı kenarına olan uzaklığı ise en az 15 mm olacak şekilde yerleşim sağlanmıştır. Tüm işlem başamaklarının maksimum 15 dakika içinde tamamlanması sağlanarak hazırlanan MHA besiyerleri 35 ± 1 °C'de normal atmosfer koşullarında 18–24 saat inkübe edilmiştir (70). İnkübasyon sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları milimetre (mm) cinsinden ölçülmüştür. Değerlendirme, firma önerileri doğrultusunda inhibitör içeren disklerin zon çaplarının meropenem diski ile karşılaştırılması esasına göre yapılmıştır.

Meropenem + fenilboronik asit (MR+BO) diski ile meropenem diski arasında ≥4 mm zon artışı KPC pozitifliği, meropenem + EDTA (MR+ED) diski ile meropenem

diski arasında ≥5 mm zon artışı MBL pozitifliği olarak değerlendirilmiştir. Meropenem + kloksasilin (MR+CL) diski ile meropenem diski arasında ≥5 mm zon artışı, AmpC hiperprodüksiyonu ile birlikte porin kaybı ve/veya effluks pompası aktivitesi lehine yorumlanmıştır. İnhibitörlü diskler ile anlamlı zon artışı saptanmayan izolatlarda, temosilin (TMO, 30 µg) diskinde zon çapının <11 mm olması durumunda sonuçlar OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif yönünde değerlendirilmiştir. Firma önerileri doğrultusunda çalışmada kullanılan kombinasyon disk testi değerlendirme kriterleri Tablo 9'da özetlenmiştir.

Tablo 9. Kombinasyon Disk Testi Değerlendirme Kriterleri

Disk Kombinasyonu (zon çapı -milimetre/mm)*				Enzim sınıfı
MR-(MR+BO)	MR-(MR+ED)	MR-(MR+CL)	TMO	
≥4 mm	<5 mm	<5 mm	---	KPC
<4 mm	≥5 mm	<5 mm	---	MBL
≥4 mm ve	<5 mm	≥5 mm	---	AmpC + porin kaybı veya effluks pompası
<4 mm	<5 mm	<5 mm	<11 mm	OXA-48 like

* MR; Meropenem, MR+BO; Meropenem + fenilboronik asit, MR+ED; Meropenem + EDTA, MR+CL; Meropenem + kloksasilin, TMO; Temosilin

Kullanılan kitin geçerliliği üretici firma tarafından kalite kontrol çalışmaları ile doğrulanmıştır. Üretici firmanın validasyon sürecinde, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 negatif kontrol, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146 MBL pozitif, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705 KPC pozitif ve *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13442 OXA-48 pozitif izolatları referans suş olarak kullanılmıştır.

3.4. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİNİN ÇALIŞILMASI

3.4.1. Kolistin Duyarlılık Testi Çalışılması

Çalışmada gerçek zamanlı PZR ile karbapenem direnç geni saptanan izolatlarda kolistin duyarlılığı sıvı disk elüsyon (KSDE) yöntemi kullanılarak çalışılmıştır. Kolistin için EUCAST (2025) tarafından referans yöntem olarak sıvı

mikrodilüsyon yöntemi önerilmekle birlikte, CLSI tarafından *Enterobacterales* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatları için onaylanan kolistin sıvı disk elüsyon yöntemi uygulama kolaylığı ve düşük maliyetli olması, sıvı mikrodilüsyon ile uyumlu sonuçlar vermesi nedeniyle *E.coli* izolatlarının kolistin duyarlılığının tespitinde uygulanmıştır (69,72).

KSDE yönteminde her izolat için dört adet katyon ayarlı Müeller–Hinton sıvı besiyeri (CAMHB) tüpü (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ABD) kullanılmıştır. Tüplerden üçüne 10 µg kolistin sülfat (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, İngiltere) diskleri sırasıyla 1 adet, 2 adet ve 4 adet eklenerek tüplerde sırasıyla 1 µg/mL, 2 µg/mL ve 4 µg/mL kolistin konsantrasyonları elde edilmiştir. Bir tüp ise disk eklenmeden üreme kontrolü olarak ayrılmıştır. Disklerden kolistinin sıvı besiyerine elüsyonunun sağlanması amacıyla kolistin diskleri eklenen tüpler oda sıcaklığında en az 30 dakika bekletilmiştir. Test edilecek izolatların tek koloni ekim ile üretilen taze pasajlarından Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak 0.5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonlarından her tüpe 50 µL eklenerek yaklaşık $7,5 \times 10^5$ CFU/mL son bakteri konsantrasyonu elde edilmiştir. Bakteri inokülasyonu tamamlanan tüpler normal atmosferde, 33-35°C'de 16–20 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrasında kolistin içeren tüplerde üremenin gözlenmediği en düşük konsantrasyon izolatın MİK değeri olarak kaydedilmiştir (73).

Kolistin duyarlılığının değerlendirilmesinde, KSDE yöntemi ile çalışılmış olan izolatlar arasından temsili olarak seçilen iki NDM, üç OXA-48 ve bir KPC karbapenem direnç genine sahip altı izolat altın standart yöntem kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile de çalışılarak sonuçlar arasındaki uyum değerlendirilmiştir.

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi için Sensititre™ FRCOL kolistin mikrodilüsyon paneli (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan izolatlar, koyun kanlı agarda bir gecelik inkübasyon sonrası üreme gösteren taze kültürlerden elde edilmiş; kromojenik agarlar ve eski kültürlerden çalışma yapılmamıştır. İzolat kolonilerinden Sensititre™ demineralize su (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak bakteri süspansiyonu hazırlanmış ve süspansiyon bulanıklığı Sensititre™ nefelometre (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile 0,5 McFarland standardına ayarlanmıştır.

Hazırlanan bu süspansiyondan 30 µL alınarak CAMHB (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, ABD) içerisine aktarılmıştır. Elde edilen süspansiyondan Sensititre™ mikrodilüsyon plağındaki her bir kuyucuğa 50 µL olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Hazırlanan mikroplaklar, tek kullanımlık yapışkan kapatma filmi (Thermo Scientific™, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile kapatılarak 35 ± 1 °C'de 18–24 saat süreyle normal atmosfer koşullarında inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda kuyucuklar görsel olarak değerlendirilmiştir. Üretici firma tarafından önceden tanımlanmış kolistin konsantrasyonları dikkate alınarak, bakteri üremesinin tamamen inhibe edildiği en düşük kolistin konsantrasyonu izolatın MİK değeri olarak belirlenmiştir.

Elde edilen MİK sonuçları, EUCAST tarafında 2025 yılında yayınlanan klinik sınır değerler esas alınarak izolatlar duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmıştır. *Enterobacterales* için kolistine ait klinik MİK sınır değerleri, EUCAST (2025) ve CLSI M100 (2025) rehberlerine göre Tablo 10 'da gösterilmiştir (69,72).

Tablo 10. *Enterobacterales* için Kolistin MİK klinik sınır değerleri

	CLSI MİK sınır değerleri (mg/L)		EUCAST MİK sınır değerleri (mg/L)	
	I ≤	≥ R	≤ S	> R
Enterobacterales	2	4	2	2

3.4.2. Diğer Antibiyotikler için Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Çalışılması

Çalışmada uygulanan gerçek zamanlı PZR sonrasında karbapenem direnç geni pozitif saptanan izolatlarda, tedavide alternatif olarak kullanılabilecek seftazidim–avibaktam, tigesiklin ve fosfomisin için antibiyotik duyarlılık testleri çalışılarak sonuçları değerlendirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi öncesinde tek koloni ekimi sonrasında alınan taze izolatlardan Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak 0.5 McFarland standardında hazırlanan bakteri süspansiyonları MHA (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Birleşik Krallık) besiyerine inoküle edilmiştir.

Seftazidim-avibaktam duyarlılığı, 10/4 µg'lık seftazidim-avibaktam diskleri (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, İngiltere) kullanılarak

değerlendirilmiştir. Fosfomisin duyarlılığı, disk difüzyon yöntemi ile yalnızca idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında değerlendirilebilmiştir (72). EUCAST 2025 önerileri doğrultusunda oral fosfomisin klinik kullanımı esas olarak komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonları ile sınırlı olması ve idrar dışı klinik örneklerden izole edilen izolatlarda intravenöz fosfomisin için agar dilüsyon yöntemi ile duyarlılık çalışılması önerildiğinden idrar dışı izolatlarda uygulanmamıştır. Fosfomisin antibiyotik duyarlılık testi için EUCAST önerisi doğrultusunda 50 µg glukoz-6-fosfat ilaveli 200 µg'lık fosfomisin içeren diskler (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, İngiltere) kullanılmıştır.

EUCAST kılavuzunda tigesiklin için referans yöntem olarak tanımlanan sıvı mikrodilüsyon testinin, günlük hazırlanan taze besiyerlerinin kullanım gerekliliği, standardizasyon gereksinimi ve iş gücü ihtiyacı nedeniyle rutin laboratuvar koşullarında uygulanabilirliği sınırlıdır. *E. coli* izolatları için disk difüzyon eşik değerlerinin ve MİK değerlerinin tanımlanmış olması nedeniyle tigesiklin duyarlılığı disk difüzyon yöntemi ve MİK belirlenmesi için gradyent test kullanılarak değerlendirilmiştir. Disk difüzyon yöntemi için 15 µg'lık tigesiklin diskleri (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, İngiltere), gradyent test için tigesiklin Etest® stripleri (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Fransa) kullanılmıştır (72).

Tüm işlem basamaklarının maksimum 15'er dakika içinde tamamlanması sağlanarak hazırlanan MHA besiyerleri 35 ± 1 °C'de normal atmosfer koşullarında 18 ± 2 saat inkübe edilmiştir. Seftazidim avibaktam, fosfomisin ve tigesiklin duyarlılıklarının değerlendirilmesi EUCAST tarafından tanımlanan klinik sınır değerler esas alınarak yapılmıştır (Tablo 11).

Tablo 11. *E. coli* izolatlarında seftazidim-avibaktam, tigesiklin ve fosfomisin için klinik sınır değerler (EUCAST'e göre)

E. coli	MİK sınır değerleri (mg/L)		Zon çapı sınır değerleri (mm)	
	S≤	R>	S≤	R>
Seftazidim-avibaktam	8	8	13	13
Fosfomisin*	8	8	24	24
Tigesiklin	0.5	0.5	18	18
*Sadece komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarında				

3.5. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada uygulanan fenotipik doğrulama yöntemlerinden mCIM, rCDM ve KDT'nin karbapenemaz üretimini saptamadaki tanısal performansının değerlendirilmesinde altın standart yöntem olarak kabul edilen genotipik gerçek zamanlı multipleks PZR sonuçları referans alınmıştır. mCIM, rCDM, KDT yöntemlerinin sonuçları excel dosyasına kaydedilerek gerçek pozitif (GP), gerçek negatif (GN), yanlış pozitif (YP) ve yanlış negatif (YN) sonuçları PZR sonuçları esas alınarak belirlenmiş ve bu veriler kullanılarak dört gözlü tablo oluşturulmuştur (74). Elde edilen tablolar üzerinden söz konusu yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük değerleri hesaplanmıştır. Çalışmada PZR yöntemiyle saptanan karbapenemaz tipleri referans alınarak KDT ile karbapenemaz tiplerinin fenotipik ayrım gücünün analizi hedeflediğinden testin duyarlılığı değerlendirilmiş ve özgüllük hesaplaması yapılmamıştır. Tanısal performans ölçütlerinin hesaplanmasında kullanılan dört gözlü tablo yapısı ve ilgili parametreler Tablo 12' de şematize edilmiştir.

Çalışmada uygulanan rCDM, mCIM ve PZR yöntemleri test sonuçları arasındaki farkı incelemek için McNemar testi, test metodları arasındaki tutarlılık derecesini belirlemek için Cohen's Kappa testi kullanılmıştır. Demografik verilerdeki kategorik değişkenler arasındaki farkın istatistiksel analizinde Ki-kare testi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir.

Çalışmada ayrıca karbapenemaz saptanmasında tarama testi olarak önerilen ertapenem ve meropenem için hem disk difüzyon zon çapları hem de MİK değerleri ayrı ayrı ele alınarak, bu parametrelerin karbapenemaz üretimini saptamadaki tanısal performansı analiz edilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi IBM SPSS Statistics 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir (75). Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile, varyansların homojenliği ise Levene testi ile değerlendirilmiştir. Karbapenem direnç genlerine (Negatif, OXA-48, NDM ve Diğer) göre ertapenem ve meropenem zon çapı ortalamalarının karşılaştırılmasında, veriler normal dağılım göstermesine rağmen varyans homojenliği varsayımı sağlanmadığı için (Levene testi, $p < 0.05$) parametrik olmayan yöntemlere alternatif olarak Welch ANOVA testi kullanılmıştır. Gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar (Post-Hoc analizler), varyans eşitliği varsayımı

gerektirmeyen Tamhane's T2 testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. Elde edilen verilerin dağılım özellikleri ve istatistiksel karşılaştırma sonuçları, Python programlama dili (v3.9) kullanılarak pandas, seaborn ve statannotations kütüphaneleri aracılığıyla görselleştirilmiştir. Veri dağılımının daha detaylı sunulması amacıyla Violin (keman) grafikleri ile Boxplot (kutu) grafikleri entegre edilerek sunulmuş; gruplar arası anlamlı farklılıklar grafik üzerinde yıldızlama yöntemiyle (*: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$, ****: $p<0.0001$) gösterilmiştir.

Tablo 12. Tanısal performans değerlendirilmesinde kullanılan dört gözlü tablo.

Değerlendirilecek Yöntem	PZR	
	POZİTİF	NEGATİF
POZİTİF	GP	YP
NEGATİF	YN	GN
GP: Gerçek Pozitif YN: Yanlış Negatif YP: Yanlış Pozitif GN: Gerçek Negatif		

Duyarlılık= GP/(GP+YN) Özgüllük= GN/(YP+GN)

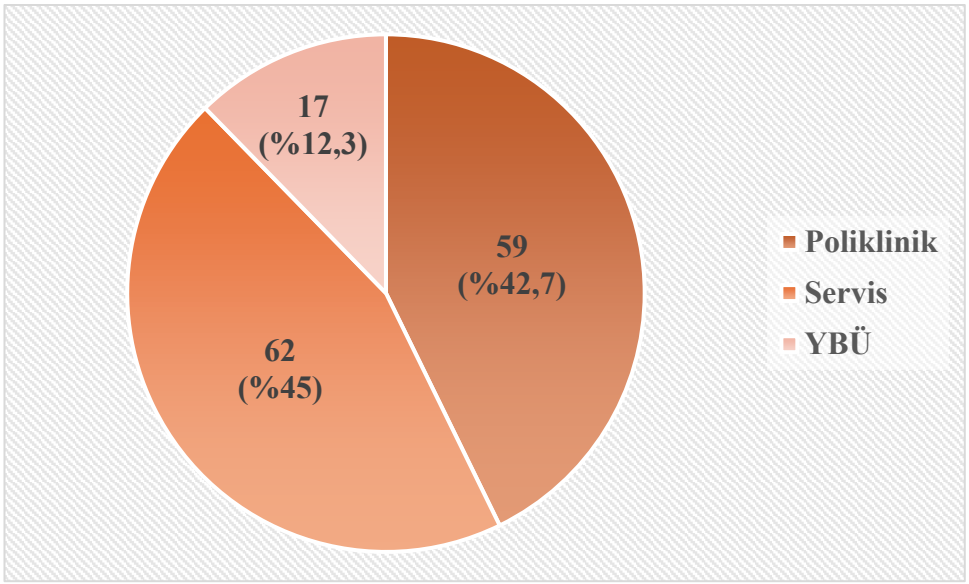
Kolistin, tigesiklin, seftazidim-avibaktam ve fosfomisine ilişkin duyarlılık sonuçları EUCAST 2025 kılavuzda tanımlanan klinik sınır değerleri göz önüne alınarak değerlendirilmiş duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Her bir antibiyotik için duyarlı ve dirençli izolatların dağılımı toplam izolat sayısı üzerinden yüzdesel olarak hesaplanmıştır (72).

4. BULGULAR

Çalışmaya Ocak 2021 ve Haziran 2025 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 138 hastaya ait *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. İzolatların seçiminde aynı hastaya ait ilk izolat çalışmaya dahil edilmiş olup tekrarlayan izolatlar çalışma dışı bırakılmıştır.

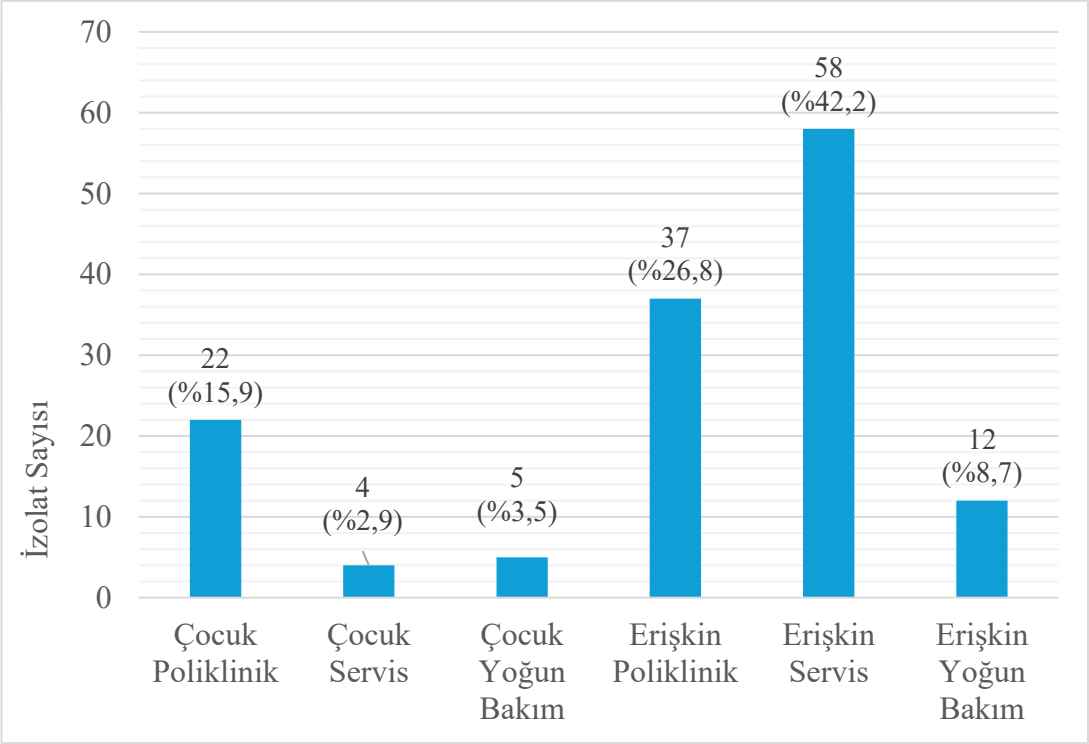
4.1. ARAŞTIRMA POPÜLASYONUNUN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİ

Çalışmaya dahil edilen 138 hastanın 85'i (%61,6) kadın, 53'ü (%38,4) erkek olup, yaş aralıkları 0-94 yaş (ortalama 49) saptanmıştır. Yaş dağılımı incelendiğinde hastaların 31'inin (%22,4) 18 yaş altı, 58'inin (%42) 18-64 yaş aralığında, 49'unun (%35,6) 65 yaş ve üzerinde olduğu görülmüştür. İzolatların 59'u (%42,7) poliklinik, 17'i yoğun bakım üniteleri olmak üzere 79'u (%57,3) servislerde yatan hastalardan izole edilmiştir (Şekil 9).



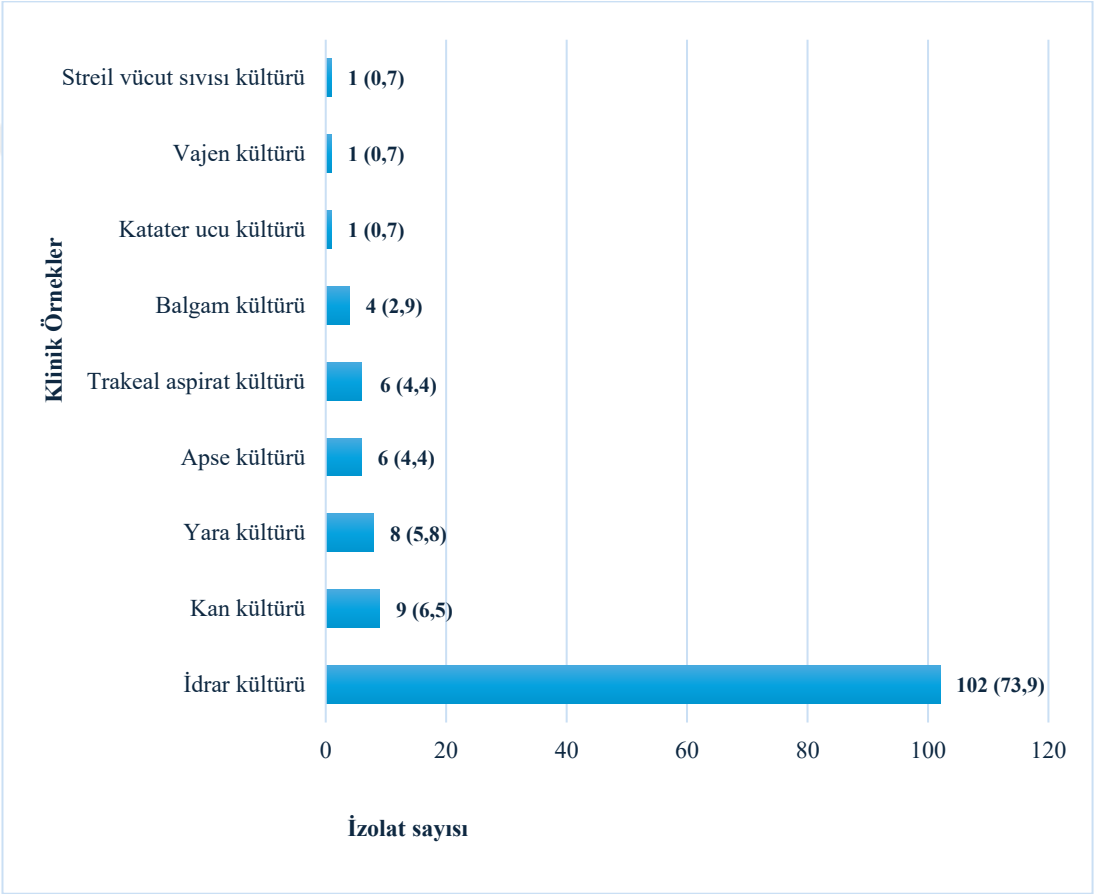
Şekil 9. *E. coli* izolatlarının poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalara göre dağılımı

Örneklerin gönderildiği kliniklere göre dağılımı incelendiğinde; izolatların en sık erişkin servislerinde yatan (58, %42,2) ve erişkin poliklinik hastalarından (37, %26,8) izole edildiği görülmüştür. Erişkin poliklinik örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının %56,4'ünü (22) üroloji poliklinik hastaları oluşturmaktadır. Çalışmaya dahil edilen diğer izolatlar sırasıyla 22'si (%15,9) çocuk polikliniği, 12'si (%8,7) erişkin yoğun bakımı, 5'i (%3,5) çocuk yoğun bakımı, 4'ü (%2,9) çocuk servisi hastalarının örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların gönderildiği kliniklere göre dağılımı Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10. *E. coli* izolatlarının gönderildiği kliniklere göre dağılımı

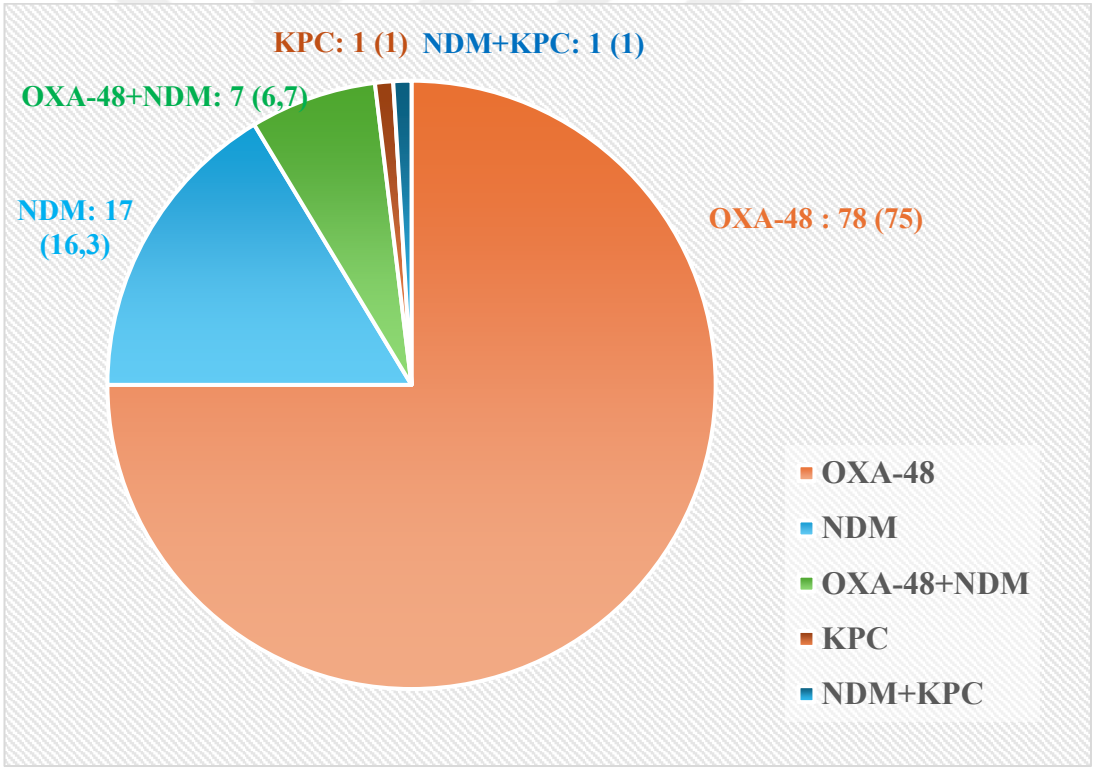
Klinik örneklerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı incelendiğinde ise izolatların büyük çoğunluğunun idrar kültürlerinden izole edildiği görülmektedir (102, %73,9). İdrar kültürlerini sırasıyla kan kültürleri (9, %6,5), yara kültürleri (8, %5,8), apse ve trakeal aspirat kültürleri (6, %4,4), balgam kültürleri (4, %2,9), vajen, kateter ucu ve steril vücut sıvısı kültürleri (1, %0,7) izlemiştir. Örneklerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı Şekil 11'de gösterilmektedir.



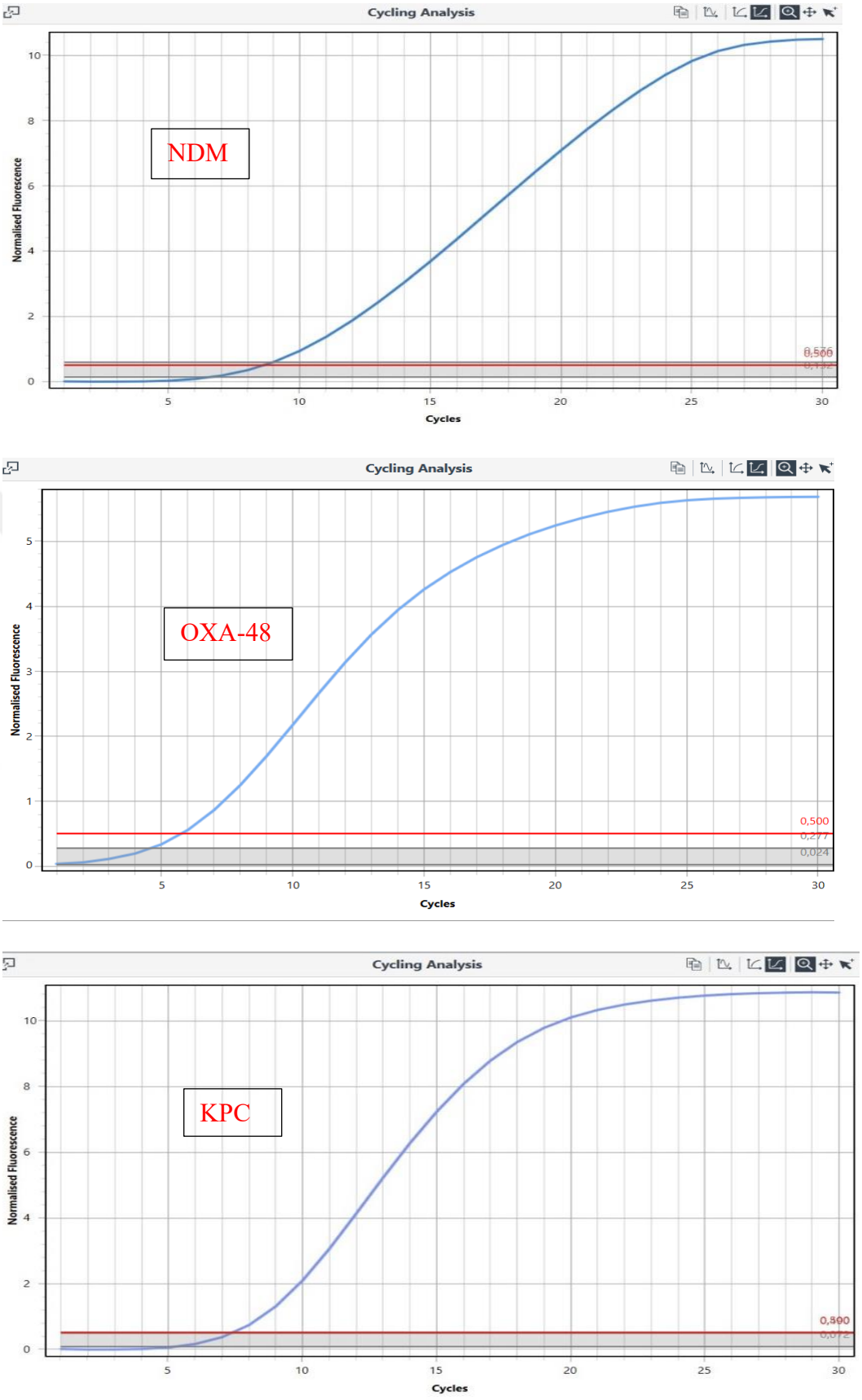
Şekil 11. Klinik örneklerin alındıkları vücut bölgelerine göre dağılımı (n (%))

4.2. MULTİPLEKS GERÇEK ZAMANLI PZR SONUÇLARI

Çalışmaya dahil edilen 138 *E. coli* izolatına uygulanan gerçek zamanlı multipleks PZR sonuçları değerlendirildiğinde 104 izolatta en az bir karbapenem direnç geni olduğu saptanmıştır. İzolatlarda en sık görülen karbapenemaz tipi 78 (%75) izolatta saptanan OXA-48 olmuştur. İzolatların 17'inde (%16,3) NDM pozitifliği, 7 'sinde (%6,7) ise OXA-48 ve NDM birlikteliği görülmüştür. Ayrıca birer izolatta (%1) KPC ve KPC-NDM birlikteliği tespit edilirken 34 izolat PZR test panelinde yer alan tüm genler açısından negatif olarak sonuçlanmıştır. İzolatların karbapenemaz tiplerine göre dağılımı Şekil 12'de ve amplifikasyon eğrileri incelenerek pozitif olarak kabul edilen izolatların sigmoidal eğri örnekleri Şekil 13'te gösterilmiştir.

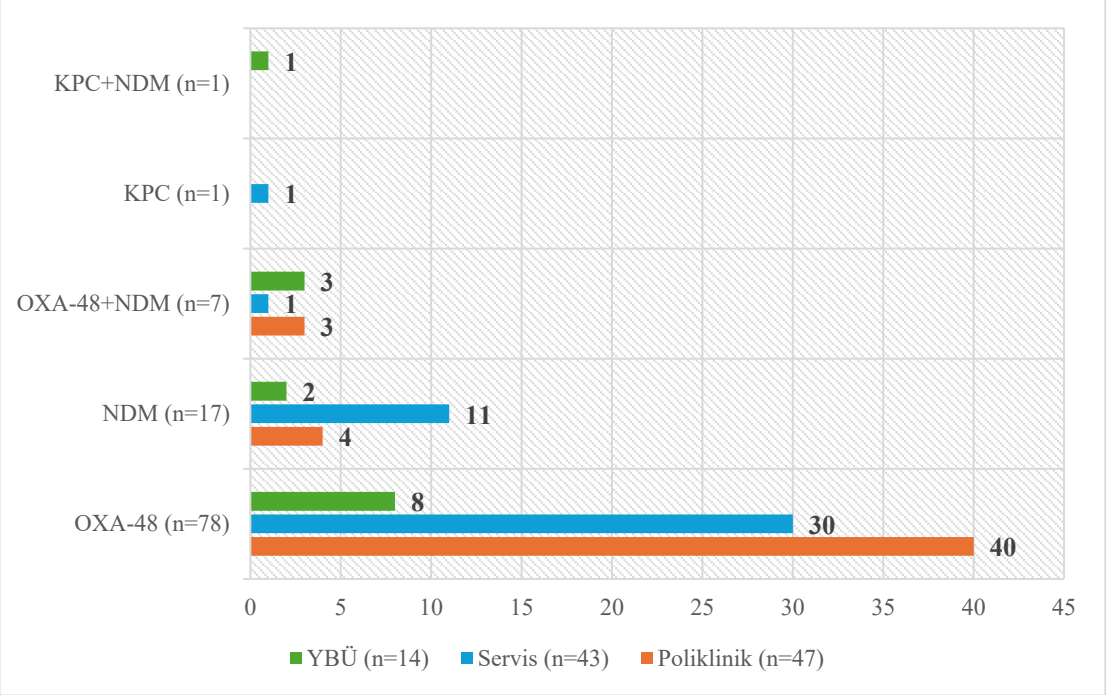


Şekil 12. *E. coli* izolatlarında karbapenemaz tiplerinin dağılımı (n (%))



Şekil 13. Threshold döngü sayısı (Cq) ≤ 26 ve RFU değeri ≥ 0.5 saptanan sigmoidal eğriler

PZR ile karbapenemaz pozitif saptanan 104 izolatın 47'si (%45,2) polikliniğe başvuran hasta örneklerinden, 57'si (%54,8) ise servis ve yoğun bakım ünitelerinde yatan hasta örneklerinden izole edilmiştir. Polikliniğe başvuran hasta örneklerinden izole edilen izolatlarda en sık OXA-48 pozitifliği (40/47, %85,1) saptanmıştır. Sonrasında sırasıyla NDM (4/47, %8,5) ve OXA-48 - NDM birlikteliği (3/47, %6,4) görülmüştür. Servislerde yatan hasta örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında da benzer olarak en sık OXA-48 pozitifliği (30/43, %69,8), sonrasında sırasıyla NDM (11/43, %25,6), OXA-48 - NDM birlikteliği (1/43, %2,3) ve KPC (1/43, %2,3) pozitifliği görülmüştür. Yoğun bakım ünitelerinde ise en sık OXA-48 (8/14, %57,2) saptanırken, iki izolatta (%14,3) NDM pozitifliği, üç izolatta (%21,4) OXA-48 - NDM birlikteliği ve bir izolatta (%7,1) ise NDM ve KPC birlikte pozitifliği görülmüştür. Çalışmada karbapenemaz pozitif saptanan izolatların poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı Şekil 14'te gösterilmiştir.



Şekil 14. Karbapenemaz pozitif izolatların poliklinik, servis ve yoğun bakım ünitelerine göre dağılımı

Çalışmada gerçek zamanlı multipleks PZR ile karbapenemaz pozitif saptanan 104 izolat incelendiğinde, kliniklere göre karbapenemaz tiplerinin genel dağılımı istatistiksel olarak sınırda bir anlamlılık göstermektedir (Genel Monte Carlo Ki-

kare p = 0,089.). OXA-48 geninin hem poliklinik (40/47, %85,1) hem de yatan hasta (38/57, %66,7) grubunda baskın gen olduğu saptanmıştır. Polikliniğe başvuran hastalar arasında OXA-48 tipi direncin prevalansı yatan hastalara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur (p < 0,05) Erişkin polikliniğinden izole edilen 28 izolattan 13'ünün (%46,3) üroloji polikliniğine sık başvuru yapan hastalara ait olduğu tespit edilmiştir. NDM pozitif izolatların ise en sık yatan hastalardan (13/57, %22,8) izole edildiği, poliklinik hasta grubunda ise daha düşük oranda (4/57, %8,5) görüldüğü saptanmıştır. Çalışmada NDM geni poliklinik hastalarına kıyasla yatan hastalarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur (p < 0,05). KPC ve ikili gen kombinasyonu görülen direnç tiplerinin dağılımı açısından poliklinik (%6,4) ve yatan (%10,5) hasta grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p > 0,05).

PZR ile karbapenemaz pozitif saptanan *E. coli* izolatlarının %62,5'i (n=65) kadın, %37,5'i (n=39) erkek hastalardan alınan klinik örneklerden izole edilmiştir. PZR ile karbapenemaz pozitifliği saptanan 104 izolat ile cinsiyet değişkeni arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (χ^2 = 0,146; p : 0,702). Karbapenemaz tiplerine göre cinsiyet dağılımları incelendiğinde; OXA-48 tipi direnç saptananların %62,8'inin (n=49) kadın, %37,2'sinin (n=29) erkek; NDM tipi direnç saptananların ise %58,8'inin (n=10) kadın ve %41,2'sinin (n=7) erkek olduğu görülmektedir. Nadir görülen KPC ve ikili gen kombinasyonlarının da cinsiyetler arasında benzer bir dağılım sergilediği görülmüştür. Karbapenemaz tipleri ile cinsiyet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamıştır (χ2= 2,606; p = ,626). Bu sonuçlar, spesifik direnç profillerinin kadın ve erkek hastalar arasında benzer oranlarda saptandığını ortaya koymaktadır (Tablo 12).

Hastaların yaş gruplarına göre PZR pozitiflik dağılımı değerlendirildiğinde, karbapenemaz pozitif saptanan izolatların %25,1'inin (n=26) 18 yaş altı, %44,2'sinin (n: 46) 18–65 yaş aralığında ve %30,7'sinin (n: 32) ise 65 yaş üzerindeki hastalardan izole edildiği belirlenmiştir. Yapılan analizde yaş grupları ile PZR pozitifliği arasında genel olarak istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (χ^2 = 4,364; p: 0,113). Karbapenemaz tiplerinin yaş gruplarına göre dağılımı incelendiğinde ise genel analiz sonucunda benzer olarak istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (χ^2 = 13,316; p: 0,101). Ancak alt grup karşılaştırmaları, belirli yaş gruplarında spesifik

genlerin özellikle NDM geninin %64,7'sinin (n: 11) 65 yaş üstü grupta yoğunlaştığını göstermektedir. NDM geninin 65 yaş üstü hastalarda görülme oranının, OXA-48 (%24,4) ve diğer genlere göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır ($p < 0,05$). Buna karşın OXA-48 geni en sık %47,4 (n: 37) oranıyla 18-65 yaş arasındaki grupta görülmüştür. Bu veriler, yaş ilerledikçe (özellikle 65 yaş üstünde) NDM geninin görülme eğiliminin arttığına işaret etmektedir.

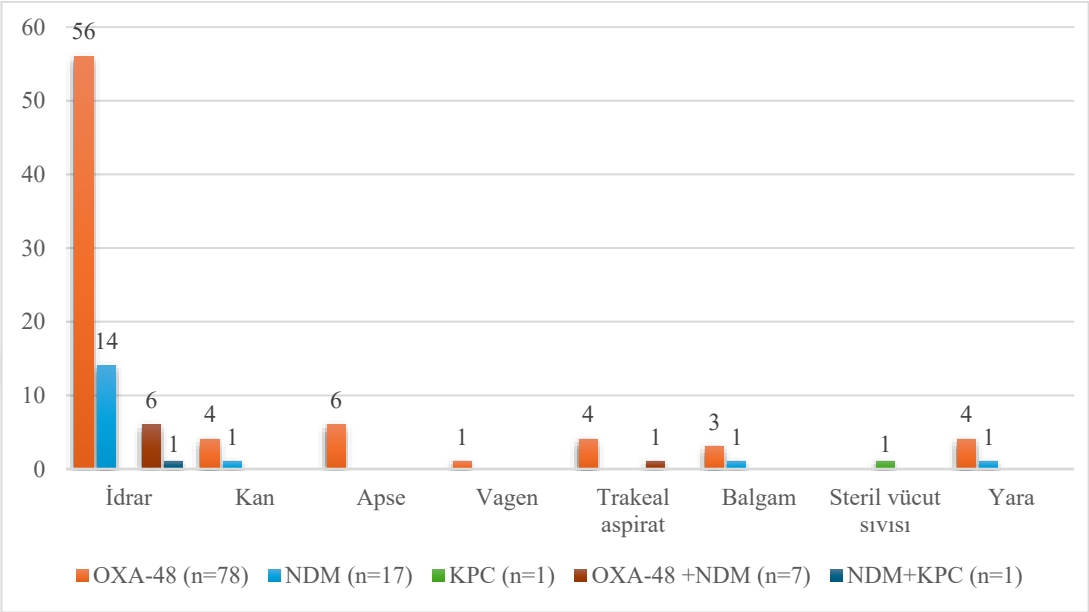
Karbapenemaz tiplerine göre çalışma grubuna dahil edilen hastalara ait demografik veriler Tablo 13'te gösterilmiştir.

Tablo 13. Karbapenemaz tiplerine göre hastalara ait demografik bilgiler

	OXA-48 (n, %)	NDM (n, %)	KPC* (n, %)	OXA-48+NDM* (n, %)	NDM+KPC* (n, %)	PZR pozitif (n, %)
Cinsiyet						
Kadın	49 (62,8)	10 (58,8)	0	5	1	65 (62,5)
Erkek	29 (37,2)	7 (41,2)	1	2	0	39 (37,5)
Yaş						
<18	22 (28,2)	2 (11,7)	0	2	0	26 (25,0)
18-65	37 (47,4)	4 (23,5)	1	3	1	46 (44,3)
>65	19 (24,4)	11 (64,7)	0	2	0	32 (30,7)
Klinik						
Erişkin Yoğun Bakım*	5	1	0	2	1	9 (8,7)
Erişkin Servis	28 (35,8)	11 (64,7)	1	1	0	41 (39,5)
Erişkin Poliklinik	23 (29,4)	3	0	2	0	28 (26,9)
Çocuk Yoğun Bakım*	3	1	0	1	0	5
Çocuk Servis*	2	0	0	0	0	2
Çocuk Poliklinik	17 (21,8)	1	0	1	0	19 (18,2)
Toplam	78 (75)	17 (16,4)	1	7 (6,7)	1	104 (100)

*Sayı az olduğu için yüzde verilmemiştir.

Karbapenemaz pozitif *E. coli* izolatlarının %74'ünün (n=77) idrar örneklerinden elde edildiği saptanmıştır. Diğer örnek türlerine ilişkin dağılımlar Şekil 15'de yer almaktadır.



Şekil 15. Karbapenemaz tiplerinin örnek türlerine göre dağılımı

4.3. PZR SONUÇLARINA GÖRE OTOMATİZE SİSTEM VE DİSK DİFÜZYON TARAMA SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada karbapenemaz üretiminin taranacağı izolatların seçilmesinde, -80ºC'de stoklanmış *E. coli* izolatları öncelikle otomatize sistem sonuçlarına göre değerlendirilmiş sonrasında Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile EUCAST tarafından önerilen meropenem ve ertapenem duyarlılığı bakılmıştır. Karbapenemaz üretiminin saptanmasında duyarlılık ve özgüllük açısından meropenemin en iyi karbapenem olduğu bildirilmektedir (76,77). Ancak düşük karbapenemaz indükleyici OXA-48 benzeri karbapenemazların gözden kaçırılmaması için duyarlılığının yüksek ancak özgüllüğünün nispeten düşük olduğu bildirilen ertapenem de karbapenemaz üreticilerinin kolay yakalanabilmesi için meropenem ile birlikte kullanılmıştır (78).

Çalışmaya dahil edilen 138 *E. coli* izolatının meropenem ve ertapenem duyarlılıkları otomatize sistem (Vitek 2 Compact) MİK değerleri ile disk difüzyon zon çapı sonuçları Tablo 13'te özetlenmiştir. İzolatların tamamında ertapenem MİK değeri

VİTEK sistemi tarafından >0,125 µg/ml olarak raporlanmıştır. Çalışma izolatlarında meropenem MİK değerleri ≤0,25–≥16 µg/ml, ertapenem MİK değerleri ise 0.25–≥8 µg/ml aralığında dağılım göstermiştir.

Karbapenemaz alt tiplerine göre değerlendirildiğinde, OXA-48 pozitif izolatlarda meropenem ve ertapenem MİK değerlerinin sırasıyla ≤0,25-4 µg/ml ve 0.25–≥8 µg/ml aralığında olduğu; NDM pozitif izolatlarda ise ≥16 µg/ml ve ≥8 µg/ml olmak üzere daha yüksek değerlerde seyrettiği izlenmiştir. OXA-48 ve NDM birlikteliği bulunan izolatlarda meropenem MİK değerlerinin 4–≥16 µg/ml, ertapenem MİK değerlerinin ise 1–≥8 µg/ml olduğu saptanmıştır. KPC ve KPC ve NDM birlikteliği gösteren pozitif birer izolatta meropenem MİK değeri ≥16 µg/ml, ertapenem MİK değeri 2 µg/ml olarak belirlenmiştir. Karbapenemaz negatif izolatlarda ise meropenem MİK değerinin ≤0,25 µg/ml, ertapenem MİK değerlerinin 0,25–1 µg/ml aralığında olduğu görülmüştür.

Disk difüzyon tarama yöntemiyle karbapenemaz negatif izolatlarda meropenem zon çaplarının 28–38 mm (ort: 30 mm), ertapenem zon çaplarının 19-24 mm (ortalama: 23 mm) aralığında olduğu görülmüştür. Karbapenemaz pozitif izolatlarda ise meropenem zon çaplarının 11–30 mm (ortalama: 24 mm.), ertapenem zon çaplarının ise 6–23 mm (ortalama: 13 mm.) arasında değiştiği saptanmıştır. Karbapenemaz pozitif izolatların meropenem ve ertapenem zon çaplarının karbapenem direnç geni taşımayan izolatlara göre daha dar olduğu izlenmiştir.

Karbapenemaz alt tiplerine göre zon çapı dağılımı incelendiğinde, en geniş zon çaplarının OXA-48 pozitif izolatlarda izlendiği görülmüştür. Bu grupta meropenem zon çapları 20–30 mm (ortalama: 26 mm.) ve ertapenem zon çaplarının ise 6–23 mm (ortalama 16 mm) arasında değiştiği saptanmıştır. En dar zon çapları NDM pozitif izolatlarda saptanmış olup, meropenem için 11–21 mm (ortalama 17 mm), ertapenem için 6–16 mm (ortalama 9 mm) olarak belirlenmiştir. OXA-48 ve NDM birlikteliği bulunan izolatlarda zon çapı değerlerinin ara düzeyde olduğu; meropenem için 15–20 mm (ortalama 18mm), ertapenem için 6–17 mm (ortalama 10 mm) olduğu izlenmiştir. KPC ve KPC+NDM pozitifliği gösteren izolatlarda ise zon çapları meropenem için sırasıyla 19 mm ve 20 mm, ertapenem için 10 mm ve 8 mm olarak ölçülmüştür. Çalışmaya dahil edilen karbapenemaz pozitif ve negatif saptanan *E. coli* izolatlarının

meropenem – ertapenem ile karbapenemaz tarama sonuçları, otomatize sistem MİK değerleri ve disk difüzyon zon çapları Tablo 14'de gösterilmiştir.

Tablo 14. Çalışma izolatlarının meropenem ve ertapenem ile karbapenemaz tarama sonuçları

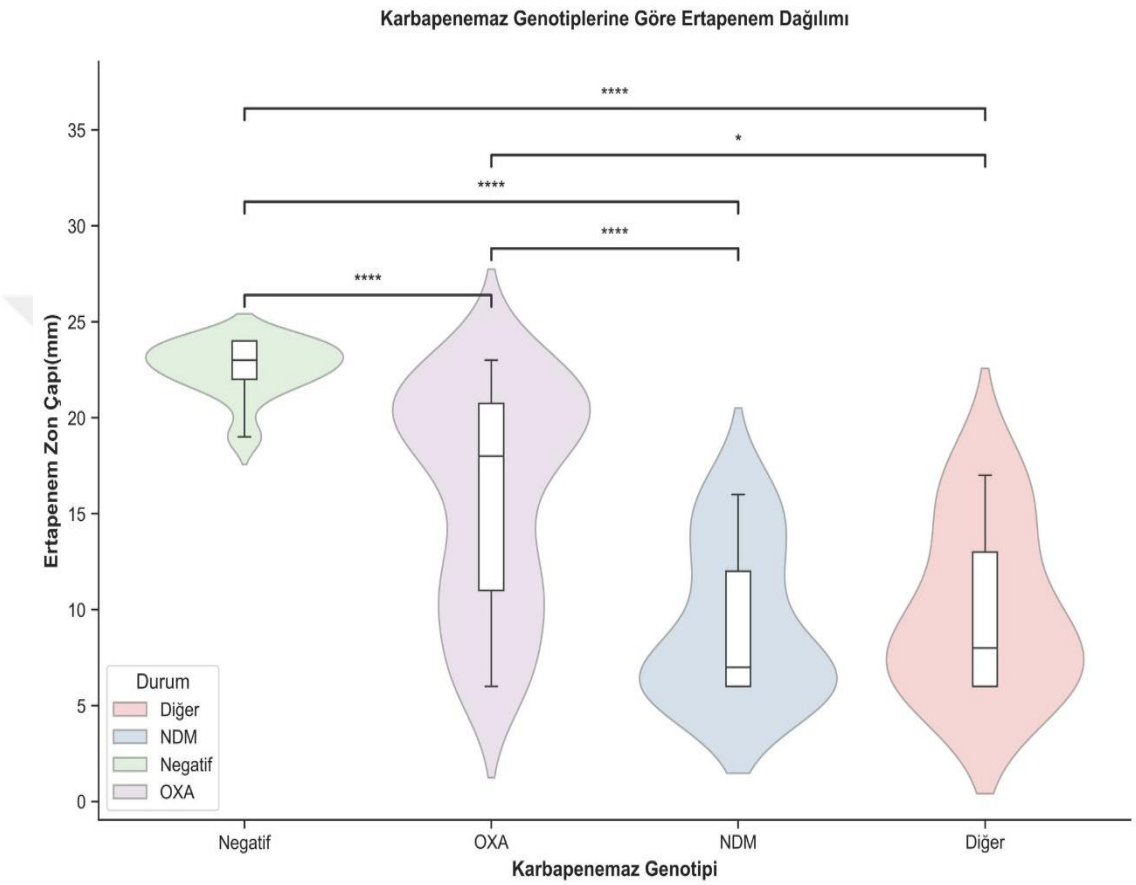
Karbapenemaz tipi	VİTEK (MİK, µg/ml)		Disk Difüzyon Zon Çapı (mm)	
	MEM	ETP	MEM	ETP
OXA-48	≤ 0,25 - 4	0,25 – ≥8	20-30	6-23
NDM	≥ 16	≥8	11-21	6-16
OXA-48+NDM	4 - ≥16	1 – ≥8	15-20	6-17
KPC	≥16	2	19	10
KPC+NDM	≥16	2	20	8
NEGATİF	≤ 0,25	0.25 - 1	28-38	19-24

MEM: meropenem ETP: ertapenem

Disk difüzyon yöntemi ile elde edilen ertapenem ve meropenem zon çaplarının karbapenemaz tiplerine göre dağılımı ve yoğunlaşma özellikleri birlikte değerlendirildiğinde, karbapenemaz negatif izolatlarda Violin (keman) grafiklerde her iki antibiyotik için zon çaplarının üst değerlere yoğunlaştığı ve dağılımın homojen olduğu izlenmiştir. OXA-48 pozitif izolatlarda özellikle ertapenem için zon çaplarının geniş bir aralığa yayıldığını, belirgin heterojenite gösterdiğini ve ölçümlerin orta–üst zonlarda yoğunlaştığını ortaya koymuştur. NDM pozitif izolatlarda ise zon çaplarının daha düşük değerlere kaydığı izlenmiş olup, zon çaplarının alt değerlere belirgin şekilde yoğunlaştığı, dağılımın dar olduğu ve heterojenitenin sınırlı kaldığı görülmüştür. OXA-48 ve NDM birlikteliği bulunan izolatlarda violin (keman) grafikler, zon çapı dağılımının OXA-48 ve NDM pozitif gruplar arasında ara bir patern sergilediğini ve orta değerlere yoğunlaştığını göstermiştir.

Ertapenem zon çapları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık saptanmıştır (Welch $\boldsymbol{F}_{(3,\ 26.8)} = 98.13$, $p < 0.001$) Tamhane's T2 post-hoc testleri ile yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; karbapenemaz negatif izolatların zon çapı ortalaması, diğer tüm gruplardan (OXA-48, NDM ve diğer genler)

istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). OXA-48 genine sahip izolatların ertapenem zon çapları, NDM ($p < 0.001$) ve diğer ($p = 0.019$) genlere göre anlamlı düzeyde daha yüksek bulunmuştur. NDM ile diğer genlerin zon çapları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (p > 0.05) (Şekil 16).

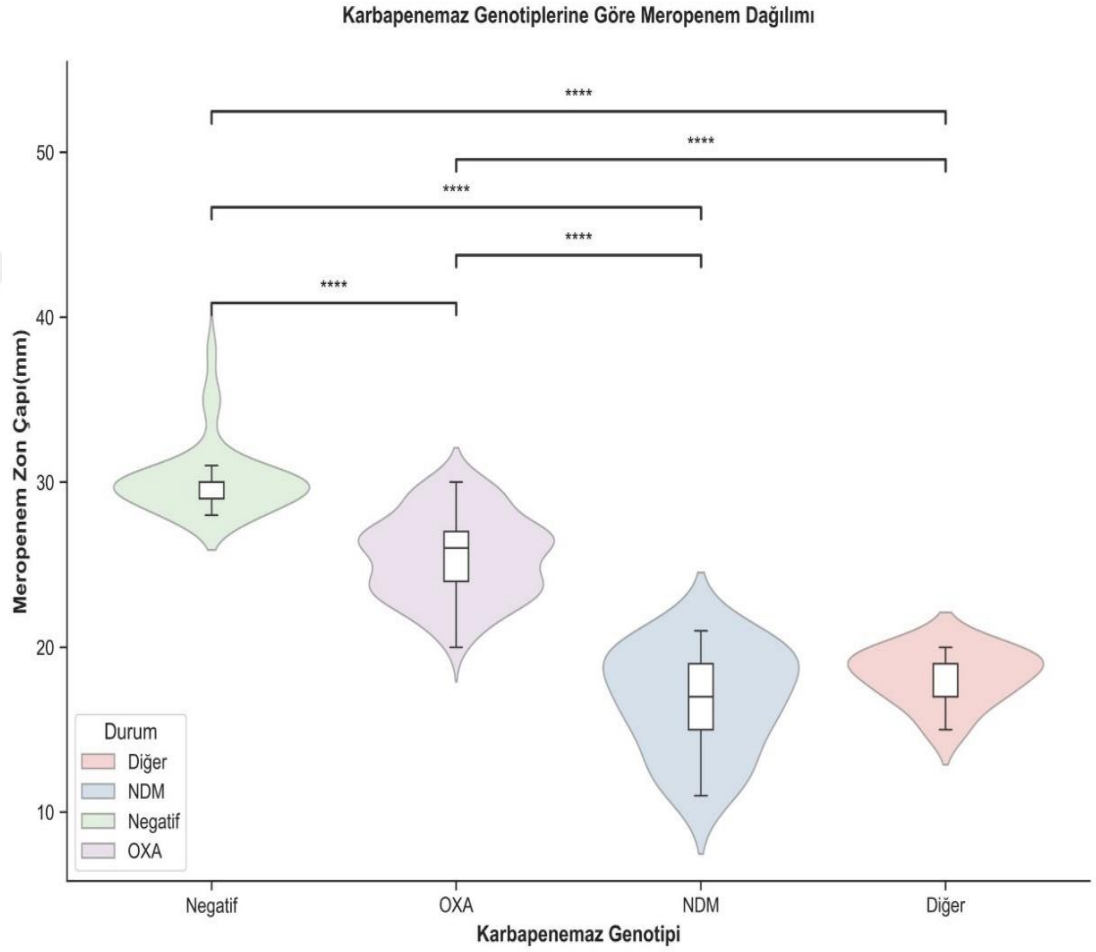


Şekil 16. Karbapenemaz tiplerine göre izolatların ertapenem zon çaplarının (mm) dağılım grafiği

*Violin (Keman) grafikleri veri dağılım yoğunluğunu, iç kısımdaki kutu grafikleri ise medyan ve çeyreklik değerleri göstermektedir. Gruplar arası karşılaştırma Welch ANOVA ve Tamhane's T2 testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde belirtilmiştir (****: p < 0.0001, *: $p < 0.05$).

Meropenem zon çapları değerlendirildiğinde de benzer şekilde gruplar arasında anlamlı fark olduğu görülmüştür (Welch $F_{(3,\ 30.1)} = 149.93$, $p < 0.001$). Post-hoc

analizlerde, karbapenemaz negatif izolatların yüksek zon çapı değerlerine sahip olduğu ve karbapenemaz pozitif izolatlardan anlamlı düzeyde ayrıştığı belirlenmiştir (*p* < 0.001). OXA-48 pozitif izolatların zon çapı değerleri NDM ve diğer genlere kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek bulunurken (p<0,001), NDM ve diğer genler arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p: 0.570) (Şekil 17).



Şekil 17. Karbapenemaz tiplerine göre izolatların meropenem zon çaplarının (mm) dağılım grafiği

* Violin (Keman) grafikleri veri dağılım yoğunluğunu, iç kısımdaki kutu grafikleri ise medyan ve çeyreklik değerleri göstermektedir. Gruplar arası karşılaştırma Welch ANOVA ve Tamhane's T2 testi ile yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri grafik üzerinde belirtilmiştir (****: p < 0.0001*).*

PZR ile karbapenemaz pozitif olarak saptanan 104 izolatın tamamında ertapenem zon çapı <25 mm olarak belirlenmiştir. Ertapenem tarama zon çapı sınır değerinin karbapenemaz saptamadaki duyarlılığı %100 olarak hesaplanmıştır.

Meropenem için zon çapı <25 mm olan izolat sayısı 58 iken, zon çapı 25–27 mm aralığında olup piperasilin-tazobaktam dirençli olan izolat sayısının 32 olduğu görülmüştür. Meropenem zon çapı ile piperasilin-tazobaktam direncinin birlikte değerlendirilmesi sonucunda, 104 karbapenemaz pozitif izolatın 90'ının tarama kriterleri kapsamında saptanabildiği belirlenmiştir. Buna karşılık yalnızca meropenem zon çapı <25 mm kriteri kullanıldığında, karbapenemaz pozitif izolatların saptanma sayısının belirgin şekilde azaldığı izlenmiştir. Ertapenem zon çapı sınır değerine göre tarama kriterlerini karşılayan karbapenemaz pozitif izolat sayısının, meropenem zon çapı ve piperasilin-tazobaktam direncinin birlikte değerlendirilmesiyle saptanan izolat sayısından daha yüksek olduğu görülmüştür. Tek başına meropenem zon çapı <25 mm kriteri kullanıldığında karbapenemaz saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %55,8 ve %100 olarak bulunmuştuır. Meropenem zon çapı <28 mm saptandığında piperasilin-tazobaktam direnci ile birlikte değerlendirilmesi durumunda duyarlılığın %86,5'e yükseldiği, özgüllüğünde ise herhangi bir kayıp izlenmediği görülmüştür. Karbapenemaz alt tiplerine göre meropenem zon çapı <25 mm kriteri kullanılarak hesaplanan duyarlılık oranlarının OXA-48 izolatlarında %41,1, OXA-48+NDM, NDM, KPC ve KPC+NDM izolatlarında ise %100 olduğu görülmüştür. EUCAST önerilerine göre OXA-48 izolatlarında piperasilin-tazobaktam değerlendirilmesinin eklenmesiyle duyarlılığın %82' e yükseldiği saptanmıştır.

Otomatize sistem ile tarama sınırının üzerinde saptanan ancak PZR ile karbapenem direnç geni saptanmayan 34 izolatın tamamında ertapenem zon çapı <25 mm karşın, meropenem zon çapı >28 mm saptanmıştır (Tablo 15).

Tablo 15. Karbapenem direnç geni pozitif ve negatif saptanan izolatların EUCAST tarama sınır değerlerine göre otomatize sistem ve disk difüzyon sonuçları

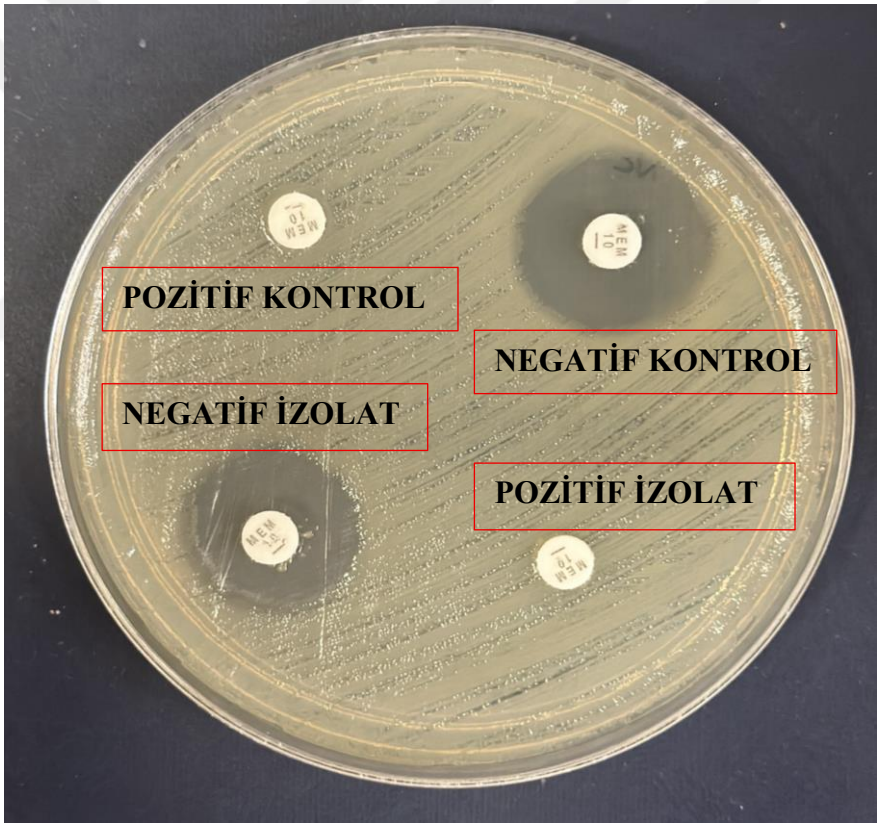
	OXA-48 (n=78)	**NDM (n=17)**	**OXA48+NDM (n=7)**	**KPC (n=1)**	**KPC+NDM (n=1)**	**Negatif (n=34)**
VİTEK (µg /ml)						
MEM > 0,25	35	17	7	1	1	0
MEM ≤ 0,25	43	0	0	0	0	34
ETP > 0,125	78	17	7	1	1	34
ETP ≤ 0,125	0	0	0	0	0	0
Disk Tarama zon çapı (mm)						
MEM > 28	14	0	0	0	0	34
MEM 25-27	32	0	0	0	0	0
MEM < 25	32	17	7	1	1	0
ETP > 25	0	0	0	0	0	0
ETP < 25	78	17	7	1	1	34

MEM: meropenem ETP: ertapenem

Çalışmada *E. coli*'lerde karbapenemaz saptanması için ertapenem ve meropenem otomatize sistem MİK değerlerine göre tarama duyarlılıkları sırasıyla %100 ve %58,7 (61/104) olarak belirlenmiştir. VİTEK otomatize sisteminin meropenem için en düşük ≤ 0.25 µg/ml MİK değeri raporlayabilmesi nedeniyle aradaki bir dilüsyonun kaçabilmesi mümkündür. Karbapenemaz pozitif saptanan izolatların tamamında ertapenem otomatize sistem MİK değerlerinin duyarlılığı %100 saptanmıştır. OXA-48 pozitif izolatlarda meropenem için duyarlılık ertapeneme kıyasla daha düşük %44,9 (35/78) bulunmuştur. Diğer tüm genler için meropenem otomatize sistem MİK değerinin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Çalışma izolatlarının seçiminde ertapenem veya meropenemin tarama MİK değerini (> 0,125 µg /ml) kullandığından, ertapenem ve meropenem MİK değerlerine göre özgüllük hesaplanmamıştır. Karbapenemaz negatif tüm izolatlarda otomatize sistem ertapenem MİK değeri >0,125 µg/ml iken meropenem MİK değeri ≤ 0,25 µg/ml olarak saptanmıştır (Tablo 15).

4.4. MODİFİYE KARBAPENEM İNAKTİVASYON METODU (mCIM) SONUÇLARI

PZR ile negatif saptanan 34 izolatın tamamının meropenem diski inhibisyon zon çapları >19 mm üzerinde saptanarak mCIM testi negatif bulunmuştur. Buna karşılık karbapenem geni taşıdığı saptanan 104 izolattan biri hariç tamamında mCIM testi pozitif saptanmıştır (Şekil 18). PZR ile OXA-48 geni pozitif meropenem MİK değeri ≤0.25 mg/L bulunan bir izolatın meropenem zon çapı 20 mm ölçülerek mCIM testi negatif saptanmıştır. Meropenem inkübasyon süresinin 4 saatten 6 saate çıkarılması ile yapılan tekrar çalışmasında zon çapı 18 mm. ölçülerek mCIM testi belirsiz olarak sonuçlanmıştır.



Şekil 18. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) sonuçları

Negatif Kontrol: Karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* ATCC 1706 inhibisyon zonu 25 mm. (Sağ üst)

Pozitif Kontrol: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ATCC 1705 inhibisyon zonu 6 mm. (Sol üst)

Pozitif İzolat: NDM geni pozitif izolat (Sağ alt) **Negatif izolat:** PZR negatif izolat (Sol üst)

Karbapenemaz tespitinde altın standart (referans) yöntem olarak kabul edilen PZR sonuçları esas alındığında çalışmada mCIM testinin duyarlılığı %99, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100 ve negatif prediktif değeri %97,1 bulunmuştur. mCIM ile PZR sonuçları karşılaştırıldığında, mCIM'in PZR ile "mükemmel uyum" gösterdiği saptanmıştır (Kappa: 0,981; p<0,001). Ayrıca mCIM ile PZR arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sistematik görüş ayrılığı olmadığı belirlenmiştir (McNemar p: 1,000). Bu bulgular mCIM'in PZR sonuçlarıyla neredeyse tamamen örtüştüğünü göstermektedir.

Karbapenem direnç genlerine göre değerlendirildiğinde mCIM testinin NDM (n: 17), OXA-48+NDM (n: 7), KPC (n: 1) ve KPC+NDM (n: 1) genlerin saptanmasındaki tanısal duyarlılığı %100 olarak belirlenmiştir. OXA-48 (n=78) geninde ise bir izolat yanlış negatif olarak saptanmış olup tanısal duyarlılığı %97,8 olarak hesaplanmıştır. Karbapenemaz tespitinde PZR sonuçları ile mCIM testi sonuçlarının karşılaştırmalı dört gözlü tablosu aşağıda sunulmuştur (79) (Tablo 16).

Tablo 16. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) ile PZR sonuçlarının karşılaştırma tablosu

	PZR Pozitif (n=104)	PZR Negatif (n=34)
mCIM Pozitif	103	0
mCIM Negatif	1	34

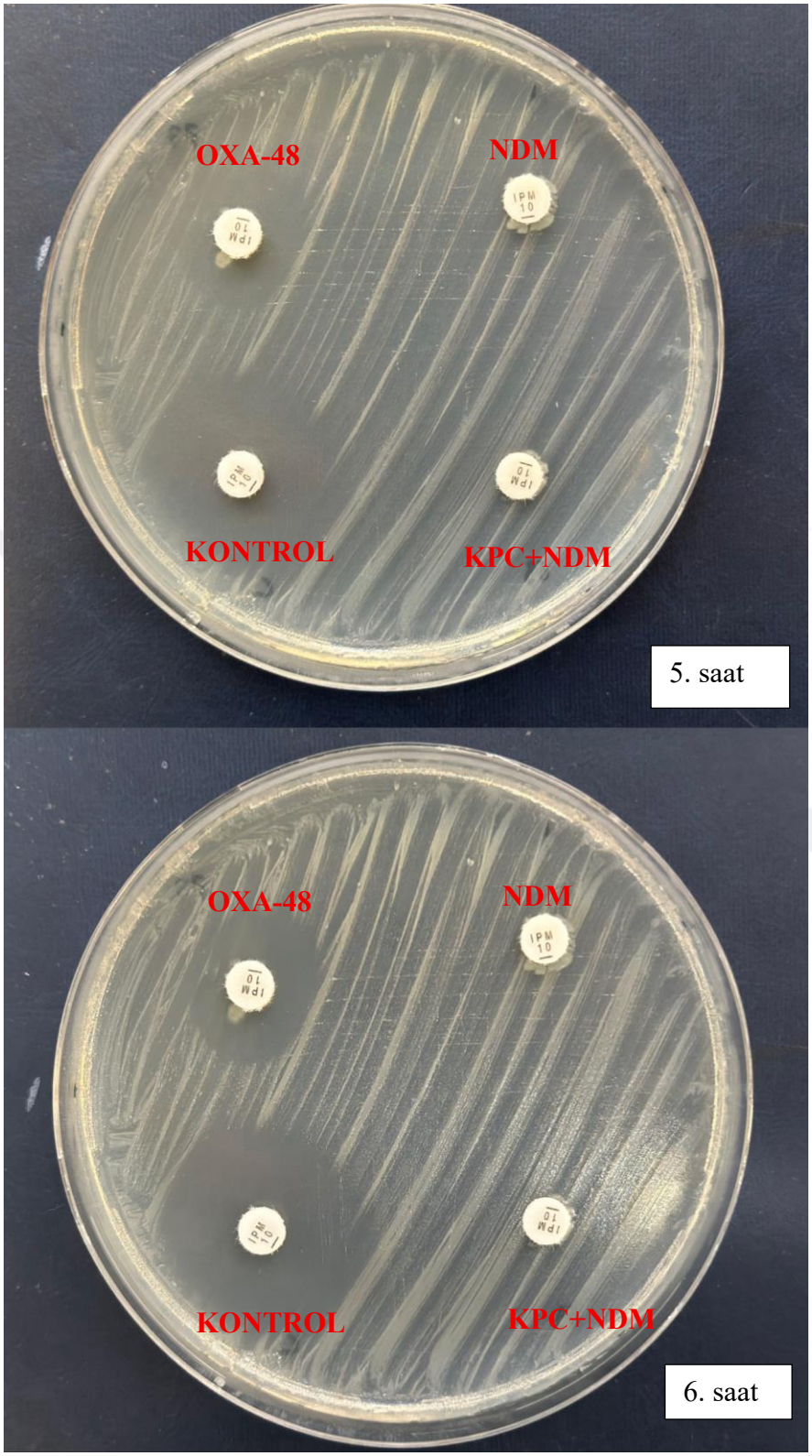
mCIM testi ile pozitif bulunan izolatların meropenem inhibisyon zon çaplarının 6–11 (ort: 6 mm) mm ve negatif olarak sonuçlanan izolatların ise zon çaplarının 22 ile 28 mm (ort: 24 mm.) arasında değiştiği saptanmıştır. mCIM test ile yanlış negatif olarak sınıflandırılan OXA-48 geni taşıyan izolatın zon çapı 20 ve 18 mm olarak ölçülmüş ve mCIM negatif izolatlarda saptanan zon çapı aralığına yakın olduğu gözlenmiştir.

PZR ile tanımlanan karbapenem direnç genlerine göre yanlış negatif olarak tanımlanan izolat dışlandığında, çalışmada OXA-48 pozitif izolatların meropenem inhibisyon zon çapları 6–11 mm arasında değişmekte iken, diğer genlere sahip izolatların hepsinde zon çapları 6 mm olarak ölçülmüştür. Yanlış negatif saptanan OXA-48 izolatı dışında karbapenem pozitif veya negatif saptanan hiçbir izolatın tekrar

çalışılmasına gerek kalmamıştır. Çalışmaya dahil edilen 138 izolatın multipleks gerçek zamanlı PZR, rCDM ve mCIM sonuçları Tablo 20'de ve zon çapları Şekil 20'de gösterilmiştir.

4.5. HIZLI KARBAPENEMAZ TESPİT METODU (rCDM) SONUÇLARI

Çalışmada PZR referans yöntemi ile karbapenemaz pozitifliği saptanan 104 izolatın 92'si rCDM ile pozitif, beşi belirsiz, yedisi ise negatif olarak değerlendirilmiştir. rCDM ile belirsiz saptanan izolatların ilk rCDM çalışmasında kontrol imipenem diski ile zon çapları farkı üç izolatta 3 mm., iki izolatta ise 4 mm. bulunurken, negatif saptanan izolatların dördünde 1 mm., birinde 2 mm., diğer ikisinde ise zon çapı farkı bulunmamıştır. rCDM belirsiz ve negatif bulunan izolatların yapılan tekrar çalışmasında belirsiz bulunan beş izolatın zon çapı farkı ≥ 5 mm. bulunarak rCDM testi pozitif olarak sonuçlanırken, yedi izolatın zon çapı farklarında değişiklik olmamış ve rCDM testi hatalı negatif olarak sonuçlanmıştır. PZR ile negatif bulunan 34 izolatın tamamı rCDM ile de negatif olarak sonuçlanmıştır (Şekil 19).



Şekil 19. Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu (rCDM) sonuçları (5 ve 6 saat).
İmipenem kontrol diski inhibisyon zon çapı 25 mm (sol alt köşe). NDM ve OXA-48 üreten rCDM pozitif izolatların zon çapları sırasıyla 6 mm ve 15 mm. (sağ üst ve sol üst köşeler). KPC+NDM üreten rCDM pozitif izolat zon çapı 6 mm. (Sağ alt köşe)

PZR referans yöntemi esas alındığında rCDM testinin duyarlılığı %93,3 ve özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır. Pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %82,9 bulunmuştur. rCDM ile PZR sonuçlarının uyumu değerlendirildiğinde, rCDM'nin PZR ile "mükemmel uyum" gösterdiği saptanmıştır (Kappa:0,872; p<0,001). Bununla birlikte, rCDM'nin PZR'ye kıyasla sistematik olarak farklı sonuçlar verebildiği ve pozitif sonuçlara negatif verme eğilimi gösterdiği belirlenmiştir (McNemar p: 0,016). Bu durum, RCDM testinin negatif prediktif değerinin (%82,93) daha düşük kalmasına neden olmuştur.

Karbapenem direnç genlerine göre rCDM'in performansı değerlendirildiğinde, yedi izolatın yanlış negatif olarak saptandığı OXA-48 (n: 78) alt tipinde testin duyarlılığı %91, tamamında rCDM testi pozitif olarak saptanan diğer genlerde (n: 26) ise testin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Karbapenemaz tespitinde PZR sonuçları ile rCDM testi sonuçlarının karşılaştırmalı dört gözlü tablosu aşağıda sunulmuştur (79) (Tablo 17).

Tablo 17. Hızlı Karbapenemaz Tespit Metodu (rCDM) ile PZR sonuçlarının karşılaştırma tablosu

	PCR Pozitif (n=104)	PCR Negatif (n=34)
rCDM Pozitif	97	0
rCDM Negatif	7	34

PZR ile karbapenemaz saptanan rCDM pozitif izolatlarda imipenem diski zon çaplarının 6–20 mm (ort: 14 mm.) arasında değiştiği ve yanlış negatif olarak sınıflandırılan yedi izolatın ise zon çaplarının 22–24 mm aralığında ölçüldüğü belirlenmiştir. rCDM negatif izolatlarda imipenem diski zon çaplarının 22–25 mm (ort: 23 mm.) arasında değiştiği saptanmıştır. Buna göre yanlış negatif olarak tanımlanan izolatların zon çaplarının, rCDM negatif izolatların zon aralığı ile örtüştüğü görülmektedir.

Karbapenem direnç genlerine göre zon çapları değerlendirildiğinde, yanlış negatif olarak tanımlanan yedi OXA-48 izolatı dışlandığında, OXA-48 pozitif saptanan izolatların zon çaplarının 6–20 mm (ort: 17 mm.) aralığında dağılım

gösterdiği belirlenmiştir. Diğer genlerde ise zon çaplarının OXA-48'e göre daha dar alanda yoğunlaştığı saptanmış olup, NDM pozitif izolatlarda 6–18 mm (ort: 7 mm.), OXA-48 ve NDM birlikte pozitif izolatlarda 6–18 mm. (ort: 12 mm.), KPC, KPC ve NDM birlikte pozitif izolatlarda ise 6 mm olduğu görülmüştür. Karbapenem direnç geni pozitif ve negatif izolatlarda rCDM test sonuçları ve zon çaplarının dağılımı Tablo 18'de gösterilmiştir.

Tablo 18. PZR ile karbapenem direnç geni pozitif ve negatif saptanan izolatlarda rCDM ve mCIM test sonuçları

***E. coli* (n: 138)**	**rCDM* (6.saat)**			**mCIM* (18.saat)**		
	Pozitif	Negatif	Zon çapı (mm.)	Pozitif	Negatif	Zon çapı (mm.)
PZR POZİTİF (n: 104)						
OXA-48 (78)	71	7	6-24	77	1	6-11**
NDM (17)	17	0	6-18	17	0	6
OXA-48+NDM (7)	7	0	6-18	7	0	6
KPC (1)	1	0	6	1	0	6
KPC+NDM (1)	1	0	6	1	0	6
PZR NEGATİF (n: 34)	0	34	22-25	0	34	22-28

*rCDM: Hızlı karbapenem tespit metodu, mCIM: Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu
**Yanlış pozitif olarak bulunan tek OXA-48 izolatının mCIM zon çapı 22 mm olarak ölçülmüş olup tabloda yer verilmemiştir.

Çalışmaya dahil edilen 138 *E. coli* izolatında, mCIM ve rCDM sonuçları karşılaştırılarak yöntemler arasındaki uyum değerlendirilmiştir. Her iki yöntemle pozitif olarak sınıflandırılan izolat sayısı 96 (%69,6), her iki yöntemle negatif olarak sınıflandırılan izolat sayısı 34 (%24,6) olarak bulunmuştur. Toplamda 138 izolatın 130'unda (%94,2) iki yöntem arasında tam uyum gözlenmiştir. Yöntemler arasındaki uyumu değerlendirebilmek için yapılan Cohen's Kappa analizi sonucunda Landis ve Koch skalasına göre iki yöntem arasında "Mükemmel düzeyde" uyum olduğu gösterilmiştir (Kappa Katsayısı 0,855, $p>0.05$). Yöntemler arasında rCDM pozitif – mCIM negatif sonuç veren 1 izolat ile rCDM negatif – mCIM pozitif sonuç veren 7

izolat olmak üzere toplam 8 izolatta uyumsuzluk saptanmıştır. Görülen uyumsuzluğun McNemar testi kullanılarak yapılan analizinde p değeri 0,070 (p>0,05) bulunmuş olup iki yöntem arasındaki dağılım farkının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Her iki test arasındaki uyum analizi Tablo 19'da gösterilmiştir.

Tablo 19. rCDM ve mCIM testleri arasındaki uyum analizi

	mCIM		Toplam	İstatistiksel Analiz
	Pozitif	Negatif		
rCDM Pozitif	96	1	97	Kappa: 0,855 (p < 0,001)
rCDM Negatif	7	34	41	McNemar p: 0,070
Toplam	103	35	138	Uyum: %94,2

*rCDM: Hızlı karbapenem tespit metodu, mCIM: Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu

Çalışmaya dahil edilen 138 izolatın multipleks gerçek zamanlı PZR, rCDM ve mCIM sonuçları Tablo 20'de ve zon çapları Şekil 20'de gösterilmiştir.

Tablo 20. Çalışmaya dahil edilen 138 izolatın multipleks gerçek zamanlı PZR, rCDM ve mCIM sonuçları ve zon çapları

	PZR*	**mCIM* (~ 18 saat)**		**rCDM* (~ 6. Saat)**			
	Sonuç	**Zon çapı (mm)**	**Sonuç**	**Zon Çapı (mm.)**		**Fark (mm.)**	**Sonuç**
				Kontrol	**İzolat**		
NC	ATCC 1706	25	Negatif	25	24	1	Negatif
PC	ATCC 1705	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
1	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
2	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
3	OXA-48	8	Pozitif	25	19	6	Pozitif
4	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
5	OXA-48	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
6	OXA-48	10	Pozitif	25	20	5	Pozitif
7	OXA-48	6	Pozitif	26	20	6	Pozitif
8	OXA-48	8	Pozitif	25	20	5	Pozitif
9	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
10	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif

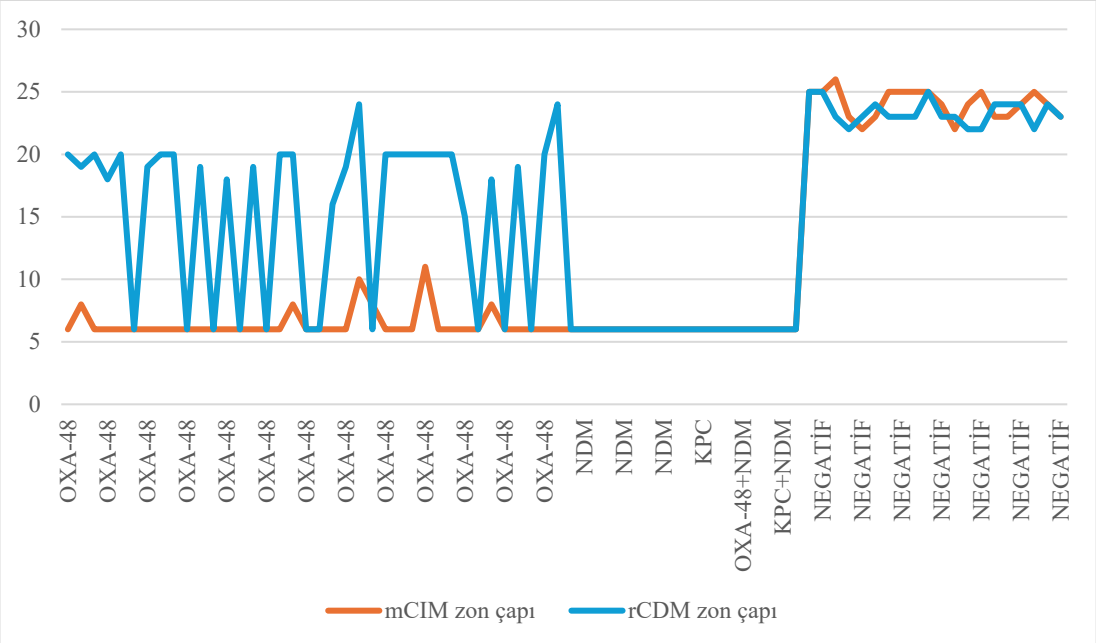
11	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
12	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
13	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
14	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
15	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
16	OXA-48	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
17	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
18	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
19	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
20	OXA-48	6	Pozitif	24	19	5	Pozitif
21	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
22	OXA-48	20	Negatif	25	20	5	Pozitif
23	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
24	OXA-48	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
25	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
26	OXA-48	8	Pozitif	24	16	8	Pozitif
27	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
28	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
29	OXA-48	6	Pozitif	24	6	18	Pozitif
30	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
31	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
32	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
33	OXA-48	6	Pozitif	26	20	6	Pozitif
34	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
35	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
36	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
37	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
38	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
39	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
40	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
41	OXA-48	6	Pozitif	25	24	1	Negatif
42	OXA-48	6	Pozitif	25	24	1	Negatif
43	OXA-48	6	Pozitif	24	24	0	Negatif
44	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
45	OXA-48	6	Pozitif	24	23	1	Negatif
46	OXA-48	6	Pozitif	24	22	2	Negatif
47	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif

48	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
49	OXA-48	8	Pozitif	25	20	5	Pozitif
50	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
51	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
52	OXA-48	6	Pozitif	25	16	9	Pozitif
53	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
54	OXA-48	10	Pozitif	24	24	0	Negatif
55	OXA-48	8	Pozitif	25	6	19	Pozitif
56	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
57	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
58	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
59	OXA-48	11	Pozitif	25	20	5	Pozitif
60	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
61	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
62	OXA-48	6	Pozitif	24	15	9	Pozitif
63	OXA-48	6	Pozitif	24	19	5	Pozitif
64	OXA-48	8	Pozitif	25	18	7	Pozitif
65	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
66	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
67	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
68	OXA-48	10	Pozitif	25	20	5	Pozitif
69	OXA-48	6	Pozitif	26	18	8	Pozitif
70	OXA-48	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
71	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
72	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
73	OXA-48	6	Pozitif	25	16	9	Pozitif
74	OXA-48	6	Pozitif	25	19	6	Pozitif
75	OXA-48	6	Pozitif	25	16	9	Pozitif
76	OXA-48	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
77	OXA-48	6	Pozitif	25	20	5	Pozitif
78	OXA-48	6	Pozitif	25	24	1	Negatif
79	NDM	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
80	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
81	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
82	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
83	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
84	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif

85	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
86	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
87	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
88	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
89	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
90	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
91	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
92	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
93	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
94	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
95	NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
96	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
97	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	18	7	Pozitif
98	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	17	8	Pozitif
99	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
100	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
101	OXA-48+NDM	6	Pozitif	24	6	18	Pozitif
102	OXA-48+NDM	6	Pozitif	25	15	10	Pozitif
103	KPC	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
104	KPC+NDM	6	Pozitif	25	6	19	Pozitif
105	Negatif	25	Negatif	24	24	0	Negatif
106	Negatif	24	Negatif	25	24	1	Negatif
107	Negatif	28	Negatif	25	23	2	Negatif
108	Negatif	22	Negatif	25	25	0	Negatif
109	Negatif	23	Negatif	25	25	0	Negatif
110	Negatif	22	Negatif	24	22	2	Negatif
111	Negatif	25	Negatif	25	23	2	Negatif
112	Negatif	25	Negatif	24	24	0	Negatif
113	Negatif	23	Negatif	24	23	1	Negatif
114	Negatif	25	Negatif	25	25	0	Negatif
115	Negatif	25	Negatif	25	25	0	Negatif
116	Negatif	26	Negatif	25	23	2	Negatif
117	Negatif	23	Negatif	24	22	2	Negatif
118	Negatif	22	Negatif	25	23	2	Negatif
119	Negatif	23	Negatif	25	24	1	Negatif
120	Negatif	25	Negatif	25	23	2	Negatif
121	Negatif	25	Negatif	25	23	2	Negatif

122	Negatif	25	Negatif	24	23	1	Negatif
123	Negatif	25	Negatif	25	25	0	Negatif
124	Negatif	24	Negatif	25	23	2	Negatif
125	Negatif	22	Negatif	25	23	2	Negatif
126	Negatif	24	Negatif	24	22	2	Negatif
127	Negatif	25	Negatif	24	22	2	Negatif
128	Negatif	23	Negatif	24	24	1	Negatif
129	Negatif	23	Negatif	24	24	0	Negatif
130	Negatif	24	Negatif	25	24	1	Negatif
131	Negatif	25	Negatif	24	22	2	Negatif
132	Negatif	24	Negatif	24	24	1	Negatif
133	Negatif	23	Negatif	25	23	2	Negatif
134	Negatif	23	Negatif	24	22	2	Negatif
135	Negatif	25	Negatif	25	23	2	Negatif
136	Negatif	25	Negatif	24	22	2	Negatif
137	Negatif	24	Negatif	24	23	1	Negatif
138	Negatif	24	Negatif	25	23	2	Negatif

*PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu, rCDM: Hızlı karbapenem tespit metodu, mCIM: Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu



Şekil 20. Karbapenemaz pozitif ve negatif saptanan *E. coli* izolatlarının rCDM ve mCIM inhibisyon zon çapları

4.6. KOMBİNASYON DİSK TESTİ SONUÇLARI

Karbapenemaz pozitif 104 izolata uygulanan KDT sonucunda izolatların 102'sinde karbapenemaz tipi belirlenebilmiştir. Bu 102 izolattan 80'i (%78,4) Ambler D sınıfı (OXA-48 benzeri), 20'si (%19,6) Ambler B sınıfı (MBL-NDM), 2'si (%1,9) ise Ambler A sınıfı (KPC) olarak sınıflandırılmıştır. Gerçek zamanlı PZR ile bir OXA-48 ve bir NDM geni saptanan 2 izolatta kombinasyon disk testi ile karbapenemaz tipi tanımlanamamıştır. Kombinasyon disk testi ile karbapenemaz üretiminin saptanmasında kombinasyon disk testinin duyarlılığı %98,7 (102/104 izolat) olarak saptanmıştır.

KDT ile karbapenemaz tip tayininde tek başına OXA-48 geni tespit edilen 78 izolatın 77'i, temosilin zon çapı <11 mm saptanarak Ambler Sınıf D (OXA- 48 benzeri) olarak tanımlanabilmiştir. KDT ile tanımlanamayan OXA-48 pozitif saptanan bir izolatın KDT'inde sinerji saptanmazken, temosilin zon çapı yapılan iki tekrarda 15 ve 14 mm. olarak bulunmuştur. Çalışmada OXA-48 benzeri tek gen taşıyan izolatların doğru tespit edebilmesinde KDT duyarlılığı %98,7 saptanmıştır.

KPC tek gen pozitifliği saptanan bir izolat KDT ile de Ambler Sınıf A (KPC) olarak tanımlanabilmiştir. Çalışmada KPC geni taşıyan izolat sayısı az olduğundan duyarlılık hesaplanmamıştır.

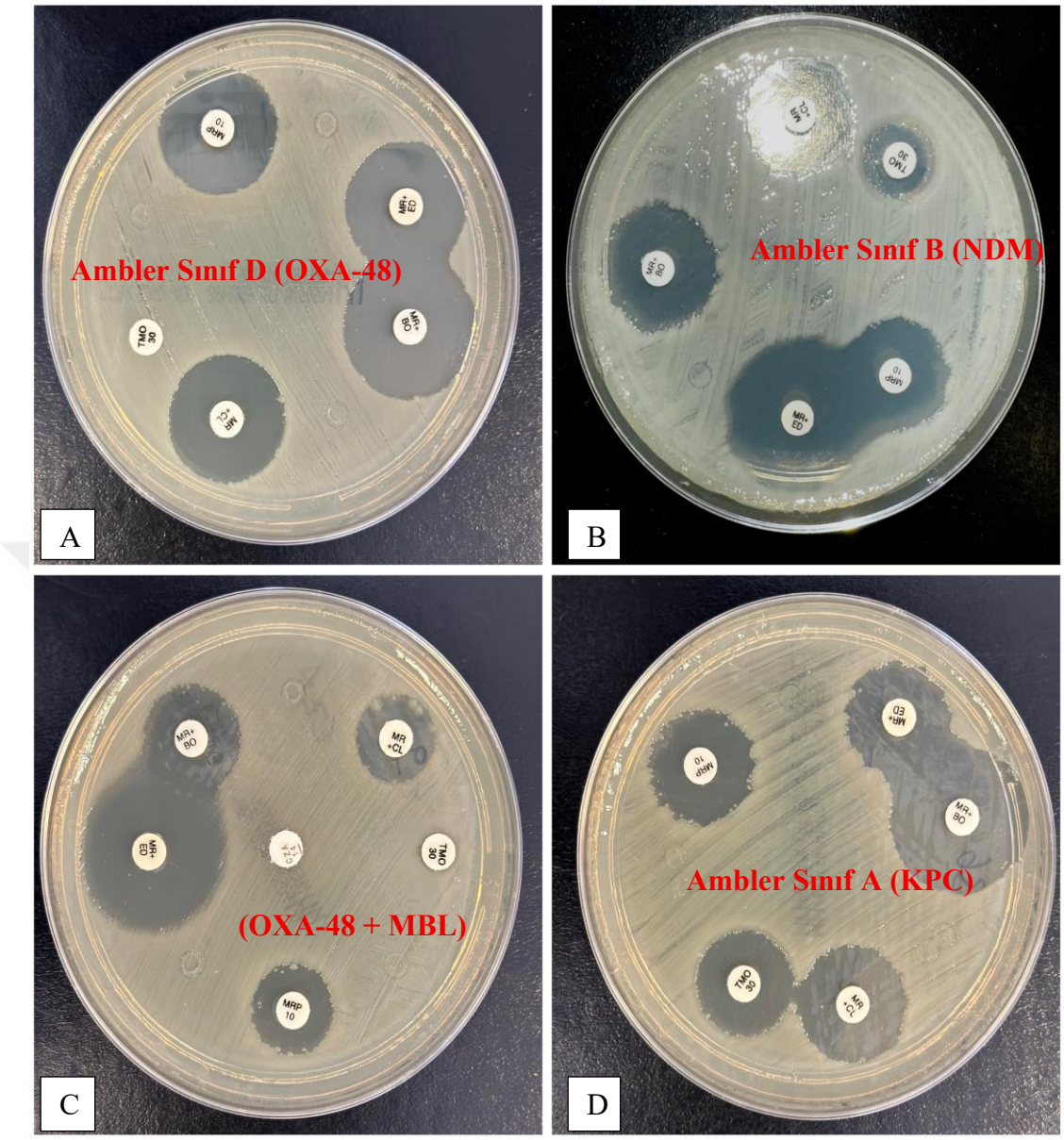
NDM tek gen pozitifliği saptanan 17 izolatın 16'sı KDT ile de Ambler Sınıf B (MBL) olarak tespit edilmiştir. KDT ile tanımlanamayan izolatın (MEM+EDTA) - MEM diski zon çapları farkı yapılan iki tekrarda da 3 mm olarak saptanmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda inhibisyon görülmesine rağmen zon çapı farkı <5 mm olduğundan karbapenemaz tipi belirlenememiştir. KDT ile Ambler Sınıf B (MBL) tek gen pozitifliğinin saptanma duyarlılığı %94,1 olarak hesaplanmıştır.

Çalışmada OXA-48 ve NDM birlikteliği saptanan yedi izolatın üçünde KDT ile sinerji saptanmazken, izolatların temosilin diski zon çapının <11 mm. olması nedeniyle hatalı olarak OXA-48 tek gen pozitifliği olarak değerlendirilmiştir. KDT çalışmasında sinerji saptanmayan üç izolatın (MEM+EDTA) - MEM diski zon çapları farkı yapılan iki tekrarda da 1-3 mm olarak saptanmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda inhibisyon görülmesine rağmen zon çapı farkı <5 mm olduğundan karbapenemaz tipi Ambler Sınıf B (NDM) olarak belirlenememiştir. Diğer dört

izolatta ise MEM+EDTA diskinin zon çapında >5mm artış ile sinerjinin varlığı gözlenmiştir. Aynı zamanda üretici firma önerilerine göre yalnızca sinerji görülmediği durumlarda değerlendirilmesi önerilen temosilin diski değerlendirildiğinde bu izolatların tamamında zon çapının <11 mm. olduğu saptanmıştır. Sinerji varlığına rağmen temosilin zon çapının <11 mm olması göz önüne alındığında izolatlar PZR ile uyumlu olarak OXA-48 ve NDM birlikte pozitif izolatlar olarak tanımlanabilmiştir.

OXA-48+NDM pozitiflerin tespitinde kullandığımız sinerji varlığında temosilin diskinin değerlendirilmesinin etkisini saptayabilmek amacıyla PZR ile tek NDM pozitifliği saptanan izolatların temosilin duyarlılıkları değerlendirilmiştir. Kombinasyon disk testinde MEM+EDTA diski ile sinerji saptanarak Ambler Sınıf B (MBL) olarak tanımlanan 16 izolatın 10'unda temosilin zon çapının <11 mm olduğu saptanmıştır. Kombinasyon disk testinde firma önerilerine uyulmaksızın sinerji varlığında temosilin zon çaplarının değerlendirilmesi, PZR ile yalnızca NDM geni pozitif bulunan 10 izolatın hatalı olarak OXA-48 ve NDM birlikteliği olarak yorumlanmasına neden olabilecektir. Bu nedenle temosilin değerlendirmesinin yalnızca sinerji olmadığı durumlarda yapılması gerekmektedir. Bu yaklaşım tek gen pozitifliklerinde duyarlılığın artmasını sağlarken, birden fazla gen pozitifliklerinde duyarlılığın azalmasına neden olmaktadır. Bu değerlendirmeler doğrultusunda KDT'nin OXA-48 ve NDM birlikteliği tespitinde duyarlılığı %57,1 (4/7 izolat) olarak kabul edilebilir.

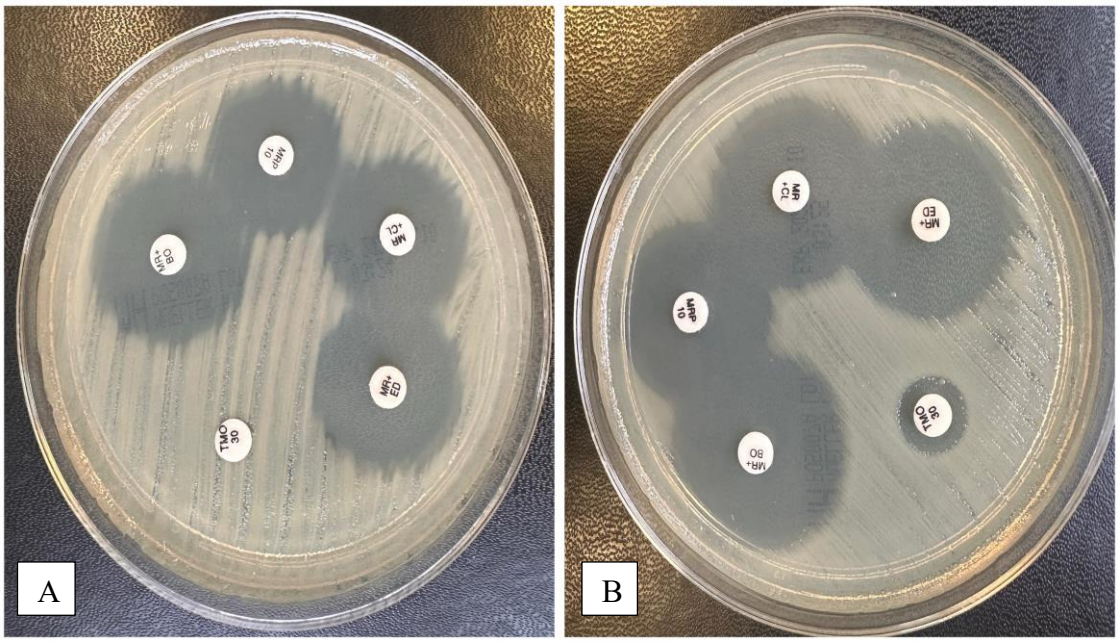
Ayrıca çalışmada KPC ve NDM birlikteliği saptanan bir izolat kombinasyon disk testi ile yalnızca KPC olarak tanımlanabilmiştir. Bu doğrultuda ikili gen pozitifliklerinde KDT'nin duyarlılığı 4/8 (%50) olarak saptanmıştır.



Şekil 21. Kombinasyon disk testi (KDT) sonuçları

A. Ambler Sınıf D (OXA-48 benzeri) pozitif izolat: Sinerji yok. Temosilin Dirençli (<11 mm)
B. Ambler Sınıf B (MBL-NDM) pozitif izolat: MEM-(MEM+EDTA) sinerji > 5 mm.
C. OXA-48+NDM pozitif izolat: MEM-(MEM+EDTA) sinerji >5 mm. Temosilin Dirençli (<11 mm)
D. Ambler Sınıf A (KPC) pozitif izolat: MEM-(MEM+BOR) sinerji > 5 mm.

Karbapenemaz tespit edilmeyen 34 izolatın kombinasyon disk testinde sinerji saptanmamıştır. Bu grupta otomatize sistem ile meropenemin tarama eşik değerlerinin üstünde bulunarak duyarlı olduğu ancak ertapenem ile MİK: 1 mg/L, disk difüzyon ile <25 mm. dirençli olarak saptanan dört izolattan ikisinin temosilin zon çapı <11 mm. olarak saptanmıştır. Karbapenemaz tespitindeki duyarlılığının düşük olması ve GSBL, AmpC beta laktamaz gibi başka direnç mekanizmalarından da etkilenebildiği bilinen Ertapenemin tarama eşik değerinin altında kaldığı izolatlarda tek başına temosilin diskine göre tanımlama yapılması hatalı olarak OXA 48 tespitine yol açabilmektedir. Bu iki izolatın mCIM, rCDM testleri de negatif saptandığından Ambler Sınıf D (OXA-48) olarak değerlendirilmemiştir. Bu verilere göre KDT'nin özgüllüğü %94,1 (32/34) olarak saptanmıştır. Karbapenemaz negatif temosilin dirençli saptanan iki izolatın kombinasyon disk testi sonucu Şekil 22'de gösterilmiştir.

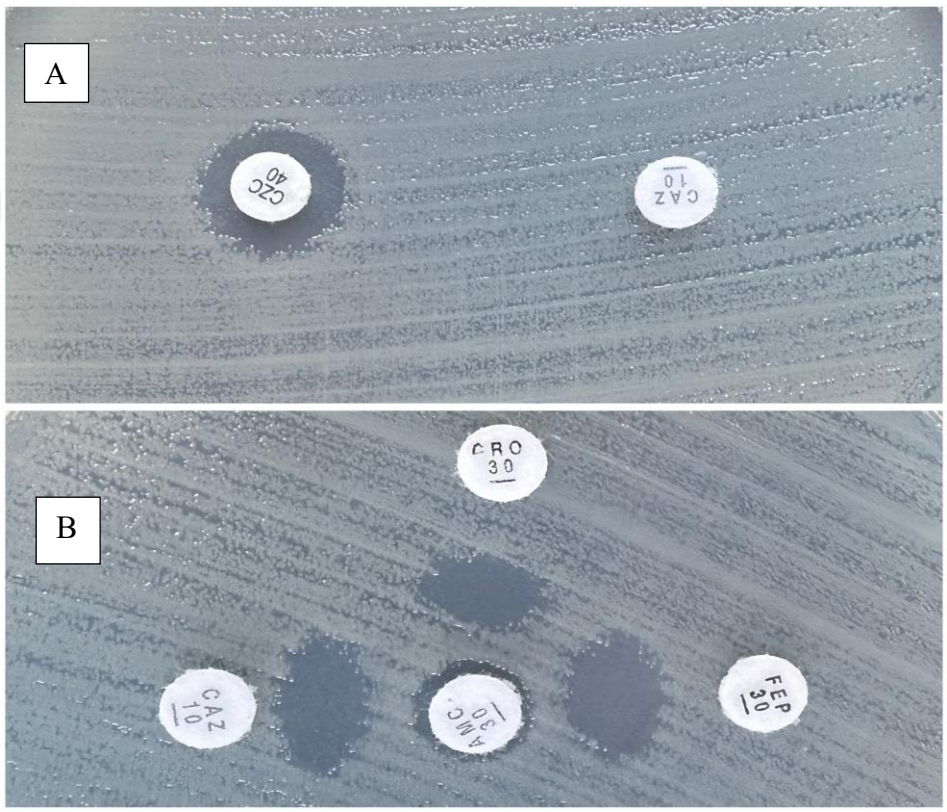


Şekil 22. Karbapenemaz negatif saptanan temosilin dirençli iki izolatın kombinasyon disk testi sonucu.

A. Karbapenemaz negatif. Sinerji yok. Temosilin Dirençli (<11 mm)

B. Karbapenemaz negatif. Sinerji yok. Temosilin Dirençli (<11 mm)

Ertapenem MİK: 1 mg/L olup disk difüzyon yöntemi ile <25 mm. olarak saptanan diğer iki izolatta temosilin zon çapı >11 mm. olarak ölçülmüştür. Bu izolatlarda GSBL varlığının değerlendirmesi amacıyla kombine disk testi ve çift disk sinerji testi uygulanmıştır. Yapılan fenotipik değerlendirmede, söz konusu izolatların GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir. Karbapenemaz negatif GSBL pozitif izolatlara ait kombine disk testi ve çift disk sinerji testi sonuçları Şekil 23'te gösterilmiştir.



Şekil 23. GSBL için A. Kombine disk testi ve B. Çift disk sinerji testi sonuçları

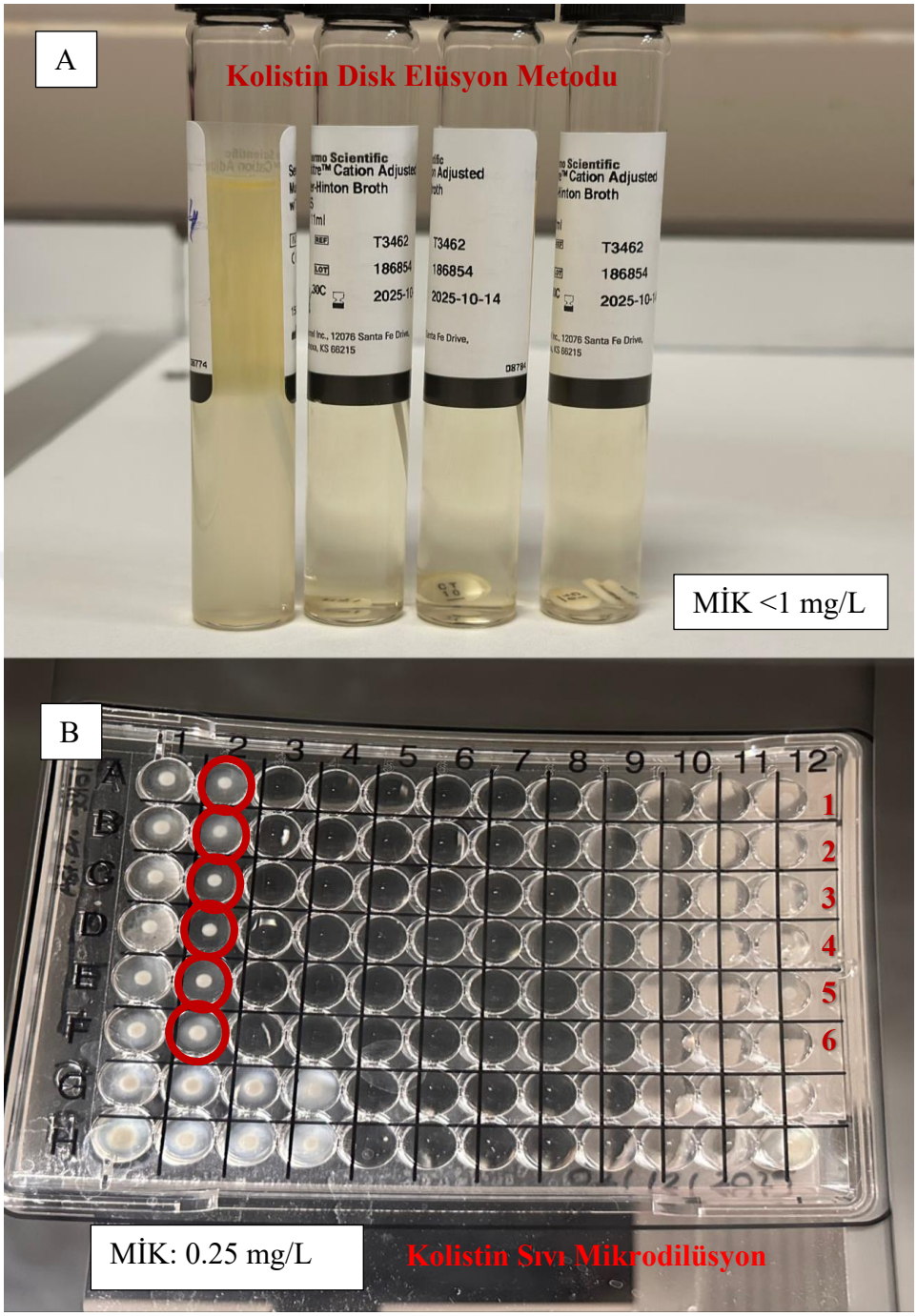
4.7.ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

Karbapenemaz pozitif izolatlarda EUCAST klinik sınır değerlerine göre otomatize sistem ile belirlenen MİK değerleri esas alınarak meropenem duyarlılığı değerlendirildiğinde, izolatların 77'sinin (%74,0) duyarlı, 17'inin (%16,3) yüksek dozda duyarlı, 20'inin (%19,2) ise dirençli kategorisinde bulunduğu belirlenmiştir. Ertapenem için yapılan değerlendirmede ise duyarlılık oranlarının meropeneme

kıyasla daha düşük olduğu, izolatların %14,4'ünün (n: 15) duyarlı, %85,6'ının (n: 89) ise ertapeneme dirençli olduğu saptanmıştır.

OXA-48 pozitif izolatlarda ertapenem duyarlılığı %19,2 (15/78) bulunurken, meropenem için izolatların %97,4'ünün (76/78) duyarlı, %2,6'ının (2/78) ise yüksek dozda duyarlı olduğu görülmüş ve dirençli izolat saptanmamıştır. OXA-48 ve NDM birlikteliği (n=7) gösteren izolatların tamamı ertapeneme dirençli bulunmuş ve meropeneme yalnızca 1 izolat duyarlı (%14,3), diğer 6 izolat (%85,7) ise meropeneme yüksek dozda duyarlı bulunmuştur. Diğer genler hem ertapeneme hem de meropeneme dirençli bulunmuştur.

Tüm izolatlarda kolistin duyarlılığı başlangıçta KSDE ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme sonucunda tüm izolatların MİK değeri <1 µg/ml olarak saptanmıştır. KSDE yöntemi ile elde edilen sonuçların doğrulanması amacıyla, 2 NDM, 3 OXA-48 ve 1 KPC pozitif olmak üzere toplam 6 izolat seçilerek kolistin duyarlılığı, altın standart yöntem olarak kabul edilen sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile tekrarlanmıştır. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 6 izolatın tamamında kolistin MİK değeri 0,25 µg/ml olarak belirlenmiş ve KSDE yöntemi ile tam uyum saptanmıştır (Şekil 24). Çalışmada karbapenem direnç geni pozitif saptanan izolatların tamamı (%100) kolistine duyarlı bulunmuştur.



Şekil 24. Kolistin duyarlılığı A. Sıvı disk elüsyon metodu (MİK: <1 µg/ml) B. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi (MİK: 0,25 µg/ml) sonuçları

EUCAST önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile yalnızca idrar örneklerinden izole edilen *E. coli'* lerde fosfomisin duyarlılığı değerlendirilmiştir. Çalışmada idrar örneklerinden izole edilen 56 OXA-48 pozitif izolatın 55'i (%98,2) fosfomisine duyarlı, 1'i (%1,8) dirençli bulunmuştur. NDM pozitif izolatların ise 12'si

(%85,7) fosfomisine duyarlı, 2'si (%14,3) dirençli olarak saptanmıştır. Diğer genlere sahip idrar izolatlarının tamamı fosfomisine duyarlı bulunmuştur.

Çalışmaya dahil edilen karbapenemaz pozitif 104 izolatın disk difüzyon yöntemi ile 103'ü (%99,0) tigesikline duyarlı, NDM pozitif bir izolatın (%1) ise dirençli olduğu saptanmıştır. NDM pozitif izolatlarda tigesiklin duyarlılığı %94,1 olarak hesaplanmıştır. Diğer karbapenem direnç genlerine sahip izolatların tamamı tigesikline duyarlı bulunmuştur. Tigesiklin gradyent testi ile MİK değerlerine göre duyarlılık değerlendirildiğinde; 15'inin (%14.4) dirençli, 89'unun (%85,6) ise duyarlı olduğu bulunmuştur. İzolatların tigesiklin MİK değerlerinin 0.125-1.5 mg/L arasında dağılım gösterdiği ve disk difüzyon ile duyarlı olarak bulunan 14 izolatın gradyent test ile dirençli olarak saptandığı görülmüştür. OXA-48 pozitif izolatların tigesiklin MİK değerlerinin 0.125-1.5 mg/L arasında dağılım gösterdiği ve duyarlılığın %88.5 (69/78) olduğu, NDM pozitif izolatların 0.19-1.5 mg/L arasında dağılım gösterdiği ve duyarlılığın %76,4 (13/17) olduğu, OXA-48 ve NDM birlikteliği saptanan izolatlarda ise 0.125-0.75 mg/L arasında dağıldığı ve duyarlılığın % 71,4 (5/7) olduğu saptanmıştır. KPC, KPC ve NDM birlikteliği görülen iki izolat ise tigesikline duyarlı olarak bulunmuş, MİK değerleri sırasıyla 0.125 mg/L ve 0.38 mg/L olarak saptanmıştır.

Tablo 21. Karbapenem direnç genlerine göre izolatların kolistin, seftazdim-avibaktam, fosfomisin ve tigesiklin duyarlılık sonuçları

	Kolistin (n, %)		Seftazidim-avibaktam (n, %)		Fosfomisin** (n, %)		Tigesiklin*** (n, %)	
	S	R	S	R	S	R	S	R
OXA-48 (78)	78 (100)	0	78(100)	0	55 (98,2)	1 (1,8)	69 (88,5)	9 (11,5)
NDM (17)	17(100)	0	*		12 (85,7)	2 (14,3)	13 (76,5)	4 (23,5)
OXA-48+NDM (7)	7(100)	0	*		6 (100)	0	5 (71,4)	2 (28,6)
KPC (1)	1(100)	0	1(100)	0	1(100)	0	1(100)	0
KPC+NDM (1)	1(100)	0	*		1(100)	0	1 (100)	0
Tümü	104(100)	0	79 (100)	0	75 (96,2)	3	89 (85,6)	15(14,4)

*MBL tipi karbapenemazlar doğal dirençli olduklarından seftazidim-avibaktam duyarlılığı çalışılmamıştır.

**Bu antibiyotik yalnızca idrar örneklerinde çalışılmıştır.

***Tigesiklin duyarlılığı gradyent test sonuçlarına göre değerlendirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Farklı fenotipik karbapenemaz tarama ve doğrulama yöntemlerinin, moleküler referans yöntem olan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile karşılaştırmalı performansının değerlendirildiği ve 138 *E. coli* izolatının dahil edildiği çalışmada OXA-48 (78, %75)'in baskın gen olduğu saptanmıştır. Ayrıca OXA-48'e kıyasla daha düşük oranlarda saptanmasına rağmen, NDM (17, %16,5) ve ikili gen pozitiflik (8, %7,7) oranlarının dikkat çekici düzeyde olduğu görülmüştür. Fenotipik doğrulama testleri arasında mCIM testinin referans yöntem olarak kabul edilen PZR ile yüksek uyum gösterdiği, rCDM testinin özellikle OXA-48 pozitif izolatlarda yanlış negatif sonuçlara neden olabildiği gösterilmiştir. Çalışmada PZR ile belirlenen genler göz önüne alındığında, kombinasyon disk testinin karbapenemaz tip tayininde tek tip karbapenemaza sahip izolatlarda PZR ile yüksek uyum gösterdiği ancak çift gen pozitifliklerinde sınırlı düzeyde ayırt ediciliğe sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca karbapenemaz taramasında yüksek duyarlılık gösteren ertapenemin karbapenemaz pozitif izolatların yakalanmasında meropenemden daha fazla etkili olduğu, ancak özgüllüğünün sınırlı olması nedeniyle meropenem ve ek direnç paternleriyle birlikte değerlendirilmesinin daha uygun bir yaklaşım olacağı görülmüştür.

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* (KDE), yüksek mortalite oranları, hızlı yayılım eğilimleri ve tedavi seçeneklerinin belirgin biçimde azalması nedeniyle küresel düzeyde kritik bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. 2008–2014 yılları arasında yapılan Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) global sürveyans çalışmasında incelenen 103.960 *Enterobacterales* izolatının %1,4'nün karbapenemaz ürettiği gösterilirken, 2012-2014 yılları arasında sürdürülen INFORM global sürveyans verilerinde meropeneme dirençli 961 izolatın %78,4'ünde karbapenemaz üretiminin saptanması, karbapenemazların küresel KDE izolatlarında direnç gelişiminde baskın ve temel belirleyici faktör olduğunu ortaya koymaktadır (80,81).

Yapılan çok merkezli çalışmalar ve geniş ölçekli sürveyans programlarıyla karbapenem direncinin küresel dağılımı daha net ortaya konmuştur. Otuz dokuz ülke ve beş farklı coğrafi bölgeyi kapsayan çok merkezli bir analizde 2012–2014 döneminde %2,2 olarak saptanan meropenem duyarlılık kaybının kısa sürede artış eğilimine girerek 2015–2017 döneminde %3,8'e yükseldiği gösterilmektedir. Aynı

çalışmada Amerika kıtasında KPC, Avrupa'da NDM, VIM ve OXA-48 benzeri enzimlerin, Orta Doğu ve Asya-Pasifik bölgelerinde ise özellikle OXA-48 benzeri karbapenemazların baskın olarak saptanması, meropenem duyarlılığında azalmanın bölgede dolaşımda olan karbapenemaz tipleriyle ilişkili olarak değişkenlik gösterebileceğini düşündürmektedir (82). Günümüzde ise ATLAS (Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance) global sürveyans programının 2018–2022 verilerinde de bölgesel farklılıklar görülmekle birlikte büyük çoğunluğu hastane kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkili olarak karbapenem direncindeki artış eğiliminin hala sürdüğü görülmektedir (83). Literatürde dünya genelindeki karbapenemaz olgularının büyük çoğunluğunu KPC, NDM ve OXA-48 benzeri enzimlerin oluşturduğu bilinmesine rağmen, küresel farklılıkların görülmesi karbapenemaz tiplerinin tür ve bölge düzeyinde ayrı ayrı değerlendirilmesinin gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Karbapenemazlara ilişkin güncel verilerin büyük çoğunluğu *K.pneumoniae* veya farklı *Enterobacterales* türlerini birlikte değerlendiren çalışmalardan elde edilmektedir. *K. pneumoniae'* ye kıyasla daha düşük oranlarda saptanmakla birlikte, *E. coli* izolatlarında giderek artan sıklıkta görülmeye başlanan karbapenemaz üretiminin çoğu zaman yüksek karbapenem MİK değerleri ile seyretmemesi tanısal süreçlerde gözden kaçma riskini artırmaktadır. Bunun yanı sıra, plazmidler aracılığıyla kolaylıkla taşınabilen karbapenem direnç genlerinin bağırsak florasında en yaygın bulunan mikroorganizmalardan biri olan *E. coli'* lerde görülüyor olması direnç genlerinin sessiz yayılımında önemli bir rezervuar oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Son yıllarda artık birçok ülkede karbapeneme dirençli *E. coli* izolatlarının KDE içinde giderek daha belirgin bir epidemiyolojik konuma yerleştiği bildirilmektedir. Yapılan çalışmalarda Norveç'te görülen KDE izolatlarının yarısından *E. coli'*lerin sorumlu olduğunun, Japonya ve İngiltere gibi ülkelerde ise *E. coli* 'nin başlıca karbapenemaz üreten türlerden biri hâline geldiğinin bildirilmesi bu değişime dikkat çekmektedir (48). Türkiye'de ise karbapenemaz epidemiyolojisine ilişkin en güvenilir veriler, ulusal çok merkezli çalışmalardan elde edilmektedir. Çakar ve arkadaşlarının 2014 yılında 18 merkezden topladıkları 155 klinik izolatın [21i (%13.5) *E.coli*, 134'ü (%86.5) *K.pneumoniae*] %84,6'ında OXA-48 pozitifliği görüldüğünü, NDM'in (%6,3) ikinci sırada yer aldığını, diğer gen ve gen kombinasyonlarının sınırlı sayıda

olduğunu göstermiştir (78). Bu erken dönem verilerini izleyen ve daha geniş kapsamlı olan Süzük ve arkadaşlarının 2019 yılı çalışmasında ise 26 merkezden toplanan *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında baskınlığında azalma görülmekle birlikte en sık OXA-48 (%52,2) geninin görüldüğü, KPC'nin %16,4, NDM'in %15 oranında saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca izolatların %12,6'ında OXA-48 + NDM-1 birlikteliği, %2,8'inde KPC + NDM-1 birlikteliği, %0,5'inde VIM ve %0,5'inde OXA-48 + VIM birlikteliği gibi kombinasyonların tespit edilmesi de Türkiye'de karbapenemaz çeşitliliğinin önceki yıllara kıyasla arttığını göstermektedir (46). Ülkemizdeki diğer çalışmalarda olduğu gibi bu ulusal çalışmalarda da görülen ortak özellik; örneklem yapısının çoğunlukla *K. pneumoniae* izolatlarından az sayıda diğer *Enterobacterales* izolatlarından oluşması olduğundan *E. coli* 'deki karbapenemaz paternine dair tür-spesifik bilgiler sınırlı kalmıştır. ECDC ve WHO tarafından 2024 yılında yayımlanan Antimikrobiyal Direnç Raporunda ise; 2020–2024 yılları arasında *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin Avrupa genelinde düşük düzeylerde (<%1) seyrettiği ancak Avrupa ülkelerine kıyasla Türkiye'de yüksek düzeyde ortalama %3.5 oranında görüldüğü bildirilmektedir (84). Özellikle NDM ve OXA-48 benzeri enzimlerin sadece *K. pneumoniae* ile sınırlı kalmayıp *E. coli* içinde de yaygınlaşması, bu türün hem sağlık sistemi ilişkili hem de toplum kaynaklı bulaş açısından önemli bir rezervuara dönüşmesine ve küresel KDE yükündeki payının giderek artmasına yol açmaktadır. Bu nedenle günümüzde *E. coli* artık yalnızca ikincil bir etken olarak değil, karbapenemaz yayılımında kritik bir tür olarak değerlendirilmelidir. Bu gereksinim doğrultusunda çalışmamızda *E. coli* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanması ve gen çeşitliliği değerlendirilmiştir.

Tek merkezde yürütülen çeşitli klinik örneklerden izole edilen 138 *E. coli* izolatının dahil edildiği çalışmamızda izolatların 104'ünde (%75,4) en az bir karbapenem direnç geni saptanmıştır. *E. coli* izolatlarında en sık görülen karbapenem direnç geni 78 (%75) izolatta saptanan OXA-48 olmuştur. Diğer izolatların 17'inde (%16,3) çalışmada ikinci sıklıkta tespit edilen NDM pozitifliği, 7 'sinde (%6,7) ise OXA-48 ve NDM birlikteliği görülmüştür. Ayrıca birer izolatta (%1) KPC ve KPC+NDM birlikteliği tespit edilmiştir. Karbapenemazlarda görülen bu çeşitlilik Süzük ve arkadaşlarının ulusal verilerini de desteklemektedir (9) Bu çalışmada tek merkezden çok sayıda *E. coli* izolatının değerlendirilmiş olması, fenotipik

sürveyanslarda sınırlı bilgi sağlanan tür-spesifik moleküler profilin ortaya konmasına anlamlı bir katkı sağlamaktadır. Çalışmamızda izole edilen *E. coli* izolatlarında görülen baskın genin OXA-48 saptanması literatür ile uyumlu olmakla birlikte plazmid aracılığı ile kolaylıkla taşınabildiği bilinen NDM geninin hem tek başına hem de OXA-48 ile birlikte görülme sıklığının yüksek olması kaygı vericidir. Buna karşılık KPC ve diğer nadir kombinasyonların sınırlı sayıda izlenmesi, Çakar ve arkadaşlarının bildirdiği ulusal dağılımla uyumlu olmakla birlikte *E. coli* içerisinde KPC geninin hâlen baskın bir rol üstlenmediğini göstermektedir (78). Yakın zamanda İsrail'de yapılan ulusal sürveyans çalışmasında da OXA-48-pozitif *E. coli* izolat sayısının 2016'da 41 iken, 2023'te 1.524'e yükseldiği (yaklaşık 37 katlık bir artış) bildirilmiştir (85). Bu çarpıcı artış, OXA-48 geninin *E. coli'* deki yayılım hızının epidemiyolojik bir tehdit oluşturduğuna ve bölgesel direnç epidemiyolojisinde OXA-48 grubunun önemli bir yer tuttuğunu göstererek bulgularımızı destekler niteliktedir.

Çalışmamızda OXA-48 pozitif *E. coli* izolatlarının %51,8'inin (40/78) poliklinik hastalarından gönderilen örneklerden izole edilmesi bu direnç mekanizmasının sadece hastane ortamıyla sınırlı olmadığını göstermektedir. Aynı zamanda poliklinik hasta örneklerinden izole edilen karbapenemaz pozitif izolatların %85,1'ini (40/47) OXA-48 geninin oluşturması toplum kökenli enfeksiyonlarda bu genin belirleyici bir rol oynadığını ortaya koymaktadır. 2022-2023 yıllarında izole edilen OXA-48 pozitif *E. coli* izolatlarının %57,1'inin toplum kökenli enfeksiyon kaynaklı olduğunun bildirildiği çalışma da OXA-48'in hastane dışındaki yaygınlığına dair bulgularımızı desteklemektedir (85). NDM pozitif izolatların ise servis ve yoğun bakım ünitelerinden aynı zamanda diğer yaş gruplarına göre 65 yaş üzeri hasta örneklerinden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla izole edildiği bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen bulgularda, OXA-48 direncinin toplum kaynaklı veya poliklinik başvurularında daha baskın olduğunu, NDM direncinin ise hastane yatışıyla daha ilişkili bir seyir izleme eğiliminde olduğunu göstermektedir. NDM'nin özellikle uzun süreli yatış, ciddi komorbidite ve geniş spektrumlu antibiyotik maruziyetinin eşlik ettiği sağlık hizmeti ilişkili durumlarda sık görüldüğünü bildiren Dortet ve arkadaşları bulgularıyla uyumludur (86).

Karbapenemaz pozitif *E. coli* izolatlarının daha çok kadın hastalardan (%62,3) ve idrar örneklerinden (%74) izole edilmesi; toplum kökenli üriner sistem

enfeksiyonlarının kadınlarda belirgin olarak daha sık görülmesi, bu enfeksiyonların başlıca etkeninin *E. coli* olması ve mikrobiyoloji laboratuvarlarına en sık gönderilen örneklerin idrar örnekleri olması ile açıklanabilir. Bu durum çalışmamızda OXA-48 pozitifliğinin özellikle kadın hastalarda baskın bulunmasını açıklayarak Foxman ve arkadaşlarının epidemiyolojik bulgularıyla uyumludur (87).

Farklı hidrolitik aktivite gösterdikleri bilinen karbapenemazların bölgedeki baskın genin ve dağılımının bilinmesi tanısal hataların önlenmesi için de önemlidir. Özellikle OXA-48 ve benzeri gibi düşük düzey hidrolitik aktivite gösteren genlerin endemik olduğu bölgelerde, bu tip karbapenemaz üreticisi izolatlar klinik sınır değerlere göre değerlendirildiğinde hatalı olarak karbapeneme duyarlı kategorisinde yer alabilmektedir (88). EUCAST 2017 rehberinde bu tanısal hataları önleyebilmek için meropenem ve ertapenem için duyarlılık kategorisinin belirlendiği klinik sınır değerler yanında karbapenemaz saptanması için tarama eşik değerleri de bildirmiştir. Bu nedenle meropenem ve ertapenem için minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) >0.125 mg/L olan veya disk difüzyon zon çapları sırasıyla <28 mm, <25 mm olan izolatların karbapenemaz üretimi açısından doğrulanması önerilmektedir.

Çalışmamızda PZR ile karbapenem direnç geni saptanan 104 izolatın otomatize sistemden (Vitek 2 Compact) alınan meropenem MİK değerleri ≤0,25–≥16 µg/ml, ertapenem MİK değerleri ise 0.25–≥8 µg/ml olmak üzere geniş bir dağılım aralığı göstermiştir. İzolatların tamamında ertapenem MİK değeri VİTEK sistemi tarafından >0,125 µg/ml olarak tarama eşik değerinin üzerinde raporlanmıştır. Karbapenemaz negatif izolatların tamamında meropenem MİK değeri ≤0,25 µg/ml olarak tarama sınırının altında saptanırken, ertapenem MİK değerlerinin 0,25–1 µg/ml aralığında değiştiği görülmüştür. Karbapenemaz alt tiplerine göre değerlendirildiğinde, OXA-48 pozitif izolatlarda meropenem ve ertapenem MİK değerlerinin sırasıyla ≤0,25-4 µg/ml ve 0.25–≥8 µg/ml olmak üzere geniş bir dağılım aralığında yer aldığı görülürken diğer genlerin hepsinde MİK değerleri klinik eşik değerin üzerinde dirençli saptanmıştır. Karbapenemaz tiplerinin farklı düzeylerde hidroliz kapasiteleri göstermesi nedeniyle ertapenem için MİK değerlerinin daha yüksek bantta yerleşmesi; meropenemin ise düşük, orta ve yüksek düzeyleri kapsayan geniş bir aralıkta yer alması karbapenemaz dağılımının tek tip olmayıp belirgin şekilde değişken olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızdaki *E. coli* popülasyonunda OXA-48, NDM ve KPC gibi farklı karbapenemaz tiplerinin birlikte bulunmasıyla uyumludur.

Çalışmada OXA-48 pozitif izolatların %97,4'ünün meropeneme duyarlı (76/78,) olduğu saptanmış ve izolatların %55,1'inin (43/78) meropenem MİK değeri ≤0,25 mg/L bulunmuştur. Buna karşın ertapenem duyarlılığı OXA-48 pozitif izolatların yalnızca %19,2'sinde (15/78) saptanmıştır. OXA-48 geninde meropenemde duyarlıya yakın MİK değerleri gözlenirken, ertapenemde daha yüksek MİK değerlerinin görülmesi literatür bulgularıyla uyumludur. OXA-48 pozitif *E. coli* izolatlarının dahil edildiği bir başka çalışmada da benzer şekilde %93,6'sının meropeneme duyarlı olduğu ve %77,3'ünde meropenem MİK değerinin <0,25 mg/L saptandığı bildirilmektedir (85). Tsakris ve arkadaşları, 81 OXA-48 pozitif *Enterobacteriaceae* izolatının yaklaşık %40'ında imipenem/meropenem MİK değerlerinin 0.125–2 mg/L düzeyinde düşük seyrettiğini göstermiştir (89). Amar ve arkadaşları tarafından değerlendirilen OXA-48 pozitif *Enterobacterales* alt grubunda da meropenem MİK aralığının 0.5–8 mg/L (ort: 2 mg/L), imipenem MİK aralığının ise 0.5–16 mg/L (ort: 4 mg/L) düzeyinde bulunması OXA-48'in sınırlı hidroliz gücü ile uyumlu bir profil ortaya koymaktadır (90). Çalışmamızda OXA-48 pozitif *E. coli* izolatlarında meropenem MİK değerlerinin düşük düzeyde ve ertapenem için ise daha yüksek düzeylerde saptanması hem Tsakris hem de Amar tarafından bildirilen OXA-48 fenotipini desteklemektedir. Bu durum, özellikle *E. coli'* de OXA-48 taramasının yalnızca tek bir karbapenem duyarlılık sonucuna bakılarak sınırlandırılmaması, farklı karbapenem kombinasyonlarının taramada kullanılmasının yanında diğer fenotipik veya moleküler yöntemlerle de araştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda NDM pozitif izolatlarda karbapenemler için elde edilen yüksek MİK değerleri (meropenem ≥16 mg/L, ertapenem ≥8 mg/L) metallo-beta-laktamazların güçlü karbapenem hidrolizi ile ilişkili olduğunu bildiren çalışmalarla uyumludur. Amar ve ark., NDM pozitif *Enterobacterales* izolatlarında meropenem ve imipenem MİK aralığını 2–16 mg/L, (ort: 4 mg/L), ertapenem MİK aralığını 2–16 mg/L (ort: 8 mg/L) olarak raporlamıştır (90). Fuchs ve ark.nın çalışmasında da NDM pozitif izolatların karbapenem MİK değerlerinin daha yüksek düzeyde olduğu gösterilmiştir (91). Nordmann, Naas ve Poirel'in karbapenemaz sınıflarını karşılaştırdığı derlemede; OXA-48'in görece zayıf karbapenem hidrolizi ile birlikte

özellikle ertapenem üzerinde belirgin etki gösterebildiği; KPC'nin tüm karbapenemlerde yüksek hidroliz kapasitesine sahip olduğu; NDM ve diğer metallo-beta-laktamazların ise geniş substrat yelpazesiyle çok yüksek MİK değerlerine yol açtığı belirtilmiştir (7,55). Bu çalışmada da alt gruplar düzeyinde elde edilen MİK dağılımlarının Nordmann ve Poirel'in sınıflandırmasıyla örtüşmesi, fenotiplerin karbapenemaz tipinin enzimatik özellikleriyle yakından ilişkili olduğunu ve özellikle OXA-48 tespitinde ertapenemin diğer karbapenemlere göre duyarlılığının daha iyi olduğunu göstermektedir.

Karbapenemaz taraması tam otomatize duyarlılık sistemlerinden elde edilen MİK değerleri ile yapılabilmekle birlikte düşük düzey karbapenemaz üretiminde hatalı sonuçlar görülebildiğinden şüpheli izolatlarda sıvı mikrodilüsyon veya gradyent test ile MİK belirlenmesi veya disk difüzyon ile tarama testleri uygulanması önerilmektedir (11). EUCAST karbapenemaz saptanması için taramada duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi karbapenem olan meropenemi ve duyarlılığının yüksek ancak özgüllüğünün düşük olduğu bildirilen ertapenemi önermektedir. EUCAST önerilerine göre meropenem (10 µg) ve ertapenem (10 µg) diski zon çaplarının <25 mm olması veya MİK değerlerinin >0,12 mg/L olması karbapenemaz üretimi ile ilişkilendirilerek tarama açısından anlamlı kabul edilmektedir. Meropenem için "gri alan" olarak değerlendirilen zon çapı 25–27 mm arasında olan izolatlarda duyarlılığı artırmak için piperasilin-tazobaktam ve/veya temosilin direnç paternlerine bakılması önerilmektedir (11). OXA-48' in endemik olduğu bölgelerde karbapenemaz taramasının yalnızca meropenem zon çaplarına dayandırılması, düşük düzey karbapenem hidrolizi gösteren izolatlarda yalancı negatif sonuçlara yol açabilmektedir. Huang ve arkadaşları, OXA-48 üreticilerinin baskın olduğu coğrafyalarda yürüttükleri çalışmada, meropenem gibi karbapenemlerin disk difüzyon zon çaplarının tek başına güvenilir bir tarama aracı olmadığını; buna karşılık piperasilin-tazobaktam ve özellikle temosilin direncinin OXA-48 varlığı için güçlü dolaylı belirteçler olarak tarama performansını artırabileceğini göstermiştir (92). Bu çalışmada da benzer şekilde, tek başına taramada meropenem <25 mm zon çapı eşiği kullanıldığında karbapenemaz pozitif olmasına rağmen taramada negatif kalan 32 izolatın tamamının OXA-48 pozitif olduğu görülmüş; bu durum OXA-48'in meropeneme karşı duyarlılığa yakın fenotip sergileyebilmesiyle uyumlu bulunmuştur. Meropenem zon çapı <25 mm kriteri

kullanıldığında duyarlılık oranlarının OXA-48 izolatlarında %41,1, OXA-48 dışındaki diğer genlerde ise %100 olduğu görülmüştür. Buna karşılık, meropenem zon çapı aralığının 25–27 mm'ye genişletilmesi ve EUCAST önerileri doğrultusunda piperasilin-tazobaktam direncinin tarama kriterine eklenmesi, yakalanamayan izolat sayısını 14'e düşürerek tarama duyarlılığını %82 olmak üzere belirgin biçimde arttırmıştır. Bu durum literatür ile uyumlu olarak OXA-48 geninin endemik olduğu bölgemizde meropenemin tek başına tarama ajanı olarak kullanılmasının duyarlılık açısından yetersiz kalabileceği ve piperasilin-tazobaktam direncinin taramaya entegre edilmesinin OXA-48 pozitif izolatların yakalanma oranını anlamlı biçimde artırabileceğini göstermektedir.

Özellikle OXA-48 endemik bölgelerde ertapenemin karbapenemaz taramasında meropeneme kıyasla daha duyarlı bir ajan olduğu literatürde iyi tanımlanmış bir bulgudur. Çakar ve arkadaşları, yalnızca meropenem kullanılarak yapılan taramada OXA-48 pozitif izolatların yaklaşık %10'unun kaçırılabildiğini; buna karşılık ertapenemin OXA-48 pozitif izolatların tamamında tarama pozitifliği gösterdiğini bildirmiştir (78). Potron ve arkadaşları yaptıkları çalışmada OXA-48 pozitif izolatlarda meropenem ve imipenemin duyarlı veya sınırda duyarlı kalabildiğini, buna karşın ertapenemin daha erken etkilenebildiğini göstermiştir (93). Çalışmamızda karbapenem direnç geni pozitif saptanan 104 izolatın tamamının ertapenem zon çapının tarama eşik değerinin altında ve duyarlılığı %100 olarak saptanmış olup, literatürde tanımlanan yüksek duyarlılık profiliyle uyumlu bulunmuştur. Ancak ertapenemin tarama testlerinde yüksek duyarlılığa sahip olmasına rağmen düşük özgüllüğe sahip olduğu ve tek başına ayırt edici bir ajan olarak değerlendirilmemesi gerektiği bildirilmektedir. Çünkü karbapenemaz üreticisi olmayıp, GSBL veya AmpC üreten izolatlar da bu eşikleri aşabildiğinden yanlış pozitif sonuçların elde edilmesine ve karbapenem kullanımından gereksiz yere kaçınılmasına neden olabilmektedir (11). Çalışmamızda karbapenemaz negatif izolatlarda da ertapenem tarama eşik değerlerine göre pozitiflik saptanması, Çakar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya paralel olarak ertapenemin özgüllüğünün sınırlı olabileceğine işaret etmektedir (8). Bu nedenle OXA-48 gibi her zaman yüksek düzey karbapenem direncine yol açmayan karbapenemaz tipleri göz önüne alındığında güvenilir sonuçlar

elde etmek için rutinde ertapenem ve meropenem sonuçlarının birlikte değerlendirilmesinin daha doğru bir yaklaşım olacağı düşünülmektedir (11).

Karbapenemaz üreten izolatların hızlı ve güvenilir olarak belirlenmesi için tarama eşik değerlerin altında kalan ve karbapenemaz olasılığı yüksek olan izolatların fenotipik veya genotipik yöntemler ile doğrulanması önerilmektedir (11,55). Karbapenemaz tespitinde genotipik yaklaşımlar altın standart (referans) yöntem olarak kabul edilmesine rağmen rutin laboratuvar pratiğinde yüksek maliyet, donanım ve tecrübe gerektirmeleri nedeniyle her zaman uygulanamamaktadır. Bu nedenle çalışmada *E. coli* izolatlarında karbapenemaz üretiminin daha hızlı ve kolay saptanmasına olanak sağlayan mCIM ve rCDM fenotipik yöntemleri çalışılarak performansları değerlendirilmiştir.

Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM), basit uygulama basamakları ve yüksek tanısal performansı nedeniyle CLSI tarafından önerilen özellikle sınırlı kaynaklara sahip klinik laboratuvarlarda karbapenemazların erken tespiti için yaygın olarak kullanılan uygun maliyetli bir testtir. Bu yöntemin farklı karbapenemaz tiplerinde gösterdiği duyarlılık ve özgüllük düzeyleri literatürde kapsamlı biçimde değerlendirilmiştir. Pierce ve arkadaşlarının mCIM için yürüttüğü iki aşamalı doğrulama çalışmasının ilk basamağında 92 karbapenemaz pozitif *Enterobacteriaceae* izolatı ile 23 karbapenemaz negatif izolatta mCIM duyarlılığı %99 (91/92) ve özgüllüğü %100 bulunmuştur. Çalışmada karbapenem MİK değeri düşük olan blaKPC-4 pozitif bir *Enterobacter cloacae* izolatında hatalı negatiflik gözlenmiştir. Aynı izolatların dokuz farklı laboratuvar tarafından çalışıldığı tekrarlanabilirlik çalışmasında ise OXA-48 ailesinin düşük aktivite gösteren varyantı olan OXA-232 üreten iki *K. pneumoniae* izolatın yanlış negatif rapor edildiği görülmüştür. mCIM'in yüksek duyarlılık ve özgüllüğüne rağmen düşük karbapenemaz aktivitesine sahip belirli alt tiplerde nadiren hatalı negatif olarak sonuçlanabileceği gösterilmiştir (94). ABD'de Tamma ve arkadaşlarının 191 *Enterobacterales* izolatının değerlendirildiği retrospektif çalışmalarında mCIM duyarlılığı %98, özgüllüğü %99 olarak bildirilirken, 45 *Enterobacterales* izolatının değerlendirildiği prospektif çalışmalarında ise her iki parametre için %100 doğruluk elde edilmiştir. Çalışma, özellikle OXA-48 ve NDM gibi güncel epidemiyolojide önemli yer tutan enzimlerin doğru sınıflandırılmasında mCIM'in, CIM ve diğer fenotipik doğrulama testlerine

kıyasla daha üstün bir performans sergilediğini göstermiştir (95). Özellikle OXA-48'in baskın olduğu ülkemizde 2024 yılında 65 karbapenem duyarlı ve OXA-48'in baskın gen olduğu 65 karbapenem dirençli olmak üzere toplam 130 *K. pneumoniae* izolatı ile yapılan çalışmada mCIM testinin duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak bildirilmiştir (96). Çalık ve arkadaşlarının çalışmasında ise 80'i *K. pneumoniae*, 22'si *E. coli* olmak üzere toplam 102 karbapenem dirençli izolatta mCIM ile yalancı pozitiflik veya yalancı negatiflik saptanmamış hem duyarlılık hem özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur (97). Çalışmamızda altın standart yöntem olarak PZR sonuçları referans alındığında, toplam 104 karbapenemaz pozitif izolatın 103'ünde mCIM testi pozitif saptanırken OXA-48 genine sahip bir izolatın mCIM testi negatif, tekrarında ise belirsiz olarak sonuçlanmıştır. Karbapenem direnç geni negatif saptanan 34 izolatın tamamı mCIM testi ile de negatif bulunmuştur. mCIM testinin duyarlılığı %99, özgüllüğü %100 olarak hesaplanmıştır. Çalışmada hatalı negatif saptanan OXA-48 genine sahip izolatın mCIM testi ile meropenem zon çapının tekrarlarda 20-18 mm saptanması, meropeneme karşı düşük karbapenemaz aktivitesi göstermeleri nedeniyle daha geniş inhibisyon zonu oluşturabildiklerinden karbapenemaz üretiminin maskelenebileceğini düşündürmektedir.

Jing ve arkadaşları tarafından 2019 yılında tanımlanan hızlı karbapenemaz tespit metodu (rCDM), karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının 5–6 saat içinde saptanmasında %100 duyarlılık ve %99.6 özgüllük gösteren karbapenem inaktivasyonuna dayalı hızlı bir fenotipik yöntem olarak bildirilmiştir (71). Günümüzde rutin laboratuvar koşullarında kolaylıkla uygulanabilen pratik bir yöntem olan rCDM testi ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Ülkemizde Çalık ve arkadaşlarının rCDM'yi mCIM ve moleküler yöntemlerle karşılaştırdıkları çalışmalarında testin karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında yaygın karbapenemaz tiplerini saptamada %100 duyarlılığa sahip olduğunu, mCIM ile mükemmel düzeyde (%100) uyum gösterdiğini ve rutin laboratuvar koşullarında uygulanabilir pratik bir yöntem olduğunu bildirmektedir (97). Benzer olarak, Çizmeci tarafından 2024 yılında yapılan 65 karbapenem dirençli ve 65 karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* izolatının dahil edildiği çalışmada rCDM'nin duyarlılığının ve özgüllüğünün %100 olduğu ve mCIM ile tam (%100) uyum gösterdiği saptanmıştır (96). Karbapenemaz pozitif *E. coli* izolatlarında

yapmış olduğumuz bu çalışmada PZR referans yöntem sonuçları ile karşılaştırıldığında rCDM testinin duyarlılığı diğer çalışmalardan daha düşük olmakla birlikte %93.3, özgüllüğü ise %100 olarak saptanmıştır. Karbapenem direnç genlerine göre değerlendirme yapıldığında rCDM'nin, NDM, KPC ve ikili gen birlikteliği görülen izolatlarda %100 duyarlılık gösterdiği; buna karşın OXA-48 geninde duyarlılığın %91'e gerilediği görülmektedir. Çalışmamızda, Jing ve ark.'nın yüksek aktivite gösteren KPC, NDM, IMP ve VIM genlerinin çalışıldığı *Enterobacteriaceae* izolatlarına kıyasla (71), OXA-48 geninin baskın olduğu *E. coli* izolatlarında rCDM'nin duyarlılığı daha düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada rCDM'nin zon çapı dağılımlarının ayrıntılı incelenmesi, OXA-48 içeren *E. coli* popülasyonunda testin sınırlarının daha belirgin hale geldiğini göstermektedir. rCDM ile gerçek pozitif olarak saptanan karbapenemaz pozitif izolatlarda test izolatına ait imipenem diski zon çapları 6–20 mm arasında ölçülürken, kontrol–test diski zon çapları farkı 5–19 mm arasında saptanmıştır. Karbapenemaz pozitif izolatlarda rCDM'nin yanlış negatif olarak saptandığı yedi izolatta ise zon çapları 23–26 mm, zon farkları 0–2 mm arasında bulunarak karbapenemaz negatif izolatların zon çapları ile uyumlu saptanmıştır. Buna karşılık PZR ile karbapenem direnç geni negatif saptanan izolatların tamamı rCDM ile de negatif saptanmıştır.

Karbapenemazın hızlı tespitinde rCDM testinin uygulandığı diğer çalışmalar ile mevcut çalışmamızdaki uyumsuzlukların anlaşılabilmesi için çalışmalar arasındaki temel farklılıkların analizi yapılmıştır. Diğer çalışmalarda rCDM klinik sınır değerin üzerindeki karbapenem dirençli izolatlar ile test edilmişken, mevcut çalışmamızda karbapenem tarama eşik değerin altında kalan izolatlar çalışmaya dahil edilmiştir. Bu nedenle çalışmamıza dahil edilen izolatların MİK değerleri diğer çalışmalara göre daha düşüktür. Ayrıca diğer çalışmalar *K. pneumoniae* ağırlıklı iken mevcut çalışma *E. coli* izolatları ile yapılmıştır. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ağırlıklı çalışmalarda rCDM'nin "pozitif" ve "negatif" zon profillerinin birbirinden keskin biçimde ayrıldığı ancak OXA-48 geni baskın olan düşük MİK değerlerine sahip *E. coli* izolatlarında görülen özellikle "sınıra yakın" zonların yalancı negatiflik açısından kritik bir "gri bölge" oluşturduğu ve yöntemin kullanımında dikkatli olunması gerektiğini göstermektedir. rCDM ile negatif sonuç alınan, ancak klinik veya epidemiyolojik olarak karbapenemaz üretimi şüphesi yüksek olan izolatların, mCIM gibi ek fenotipik

testlerle veya moleküler yöntemlerle doğrulanması gerektiği görülmektedir. Bu yaklaşımın, rCDM'nin hızlı taramadaki avantajını korurken, özellikle düşük seviyeli karbapenemaz aktivitesi olan izolatlarda yalancı negatiflik riskini minimize edeceğini düşünmekteyiz.

rCDM, 5-6 saat gibi kısa bir sürede sonuç vermesi, özel ekipman gerektirmemesi ve yorumunun zon çapı üzerinden değerlendirilmesi nedeniyle göreceli kolaylığı ile kaynakları sınırlı laboratuvarlar için pratik bir alternatif olma potansiyeli taşımaktadır. Nitekim, bu pratik avantajlar Çalık ve ark. (97) ile Çizmeci (96) tarafından da yapılan çalışmalarda vurgulanmış ve yöntemin rutin laboratuvar kullanımına uygunluğuna dikkat çekilmiştir. Ancak testin optimal performansı için önerilen 3 mm kalınlığında MHA plakları yöntemin uygulanabilirliğinde bir kısıtlama oluşturabilir. Rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan MHA plakları 4 mm olduğundan ticari olarak 3 mm derinlikli besiyerinin temini güç olabilmektedir. Bu nedenle kendi besiyerini hazırlayabilme kapasitesine sahip laboratuvarlar için hızlı karbapenemaz taramasında daha kolay adaptasyon sağlanabilir. Ancak düşük MİK değerlerine sahip izolatların rCDM çalışmasında dirençli fenotip gösteren izolatlara göre test diskine sürülecek inokülüm miktarına, diskin tüm yüzeyine homojen dağıtılmasına ve inhibisyon zonu ölçümlerinde daha dikkatli olunması ayrıca şüpheli durumlarda mutlaka diğer doğrulayıcı testlerle desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

mCIM ve rCDM testlerinin arasındaki uyum değerlendirildiğinde her iki yöntem arasında "mükemmel uyum" olduğu ve yöntemler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptanmıştır. Her iki testin karbapenemaz tespitinde birbirlerinin yerine güvenle kullanılabileceği ve doğrulayıcı test olarak tercih edilebilecek yöntemler oldukları gösterilmiştir.

Çalışmamızda fenotipik karbapenemaz tespiti ve tip tayini için kullanılan Liofilchem kombinasyon disk testinin (KDT) duyarlılığı %98,7 (102/104), özgüllüğü ise %94,1 (32/34) olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar, Liofilchem KDT'nin karbapenemaz taramasında yüksek duyarlılığa sahip olduğunu, ancak özgüllüğünün sınırlı olabileceğini göstermektedir. Sattler ve ark. tarafından yapılan üç farklı ticari kombinasyon disk kitinin karşılaştırıldığı çalışmada Liofilchem KDT'nin karbapenemaz saptamadaki duyarlılığı %96 ile en yüksek bulunurken, özgüllüğü %87

ile en düşük olarak raporlanmıştır. Aynı çalışmada MAST ve Rosco kitlerinin özgüllükleri daha yüksek ancak duyarlılıkları Liofilchem'e kıyasla daha düşük bulunmuştur (98). Bu nedenle çalışmamızda da olduğu gibi Liofilchem KDT'nin, duyarlılığı ön planda tutan bir tarama yaklaşımı sunduğu, ancak yanlış pozitiflik riski nedeniyle dikkatli yorumlanması gerektiği literatürle uyumlu şekilde ortaya konmaktadır.

Karbapenem direnç geni negatif saptanan izolatların ikisinde temosilinin zon çapı < 11 mm bulunarak yanlış OXA-48 pozitif olarak tanımlanmıştır. Sattler ve ark.'nın çalışmasında Liofilchem KDT ile yanlış pozitif bulunan 6 izolatın üçünde AmpC hiperprodüksiyonu, birinde CTX-M-15 ve ikisinde ise TEM-1 varlığı gösterilmiştir (98). Bu bulgular, temosilin direncinin karbapenemaz dışı farklı direnç mekanizmalarıyla da ortaya çıkabileceğini ve özgüllüğü belirgin şekilde düşürdüğünü göstermektedir. Bizim çalışmamızda OXA-48 yönünden yalancı pozitif olarak değerlendirilen iki *E. coli* izolatında dizi analizi yapılmamış olması önemli bir sınırlılık oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu izolatlarda temosilin direncinin altta yatan genetik mekanizmasının (örneğin TEM veya AmpC varlığı) doğrulanamaması fenotipik sonucun kesin olarak yorumlanmasını güçleştirmiştir.

OXA-48 benzeri karbapenemazların fenotipik olarak saptanmasında hem bu çalışmada hem de literatürde KDT'nin performansı genellikle yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda OXA-48 tek gen pozitifliği saptanan izolatlarda KDT duyarlılığı %98,7 olarak hesaplanmıştır. KDT ile tanımlanamayan bir izolatın temosilin zon çapının üretici eşik değerinin üzerinde (15 ve tekrarda 14 mm) olması dikkat çekicidir. Çakar ve ark.'nın çalışmasında OXA-48 pozitif izolatların tamamında temosilin zon çapı <12 mm bulunmuş ve OXA-48 için temosilin direncinin güçlü bir fenotipik belirteç olduğu vurgulanmıştır (78). Bizim çalışmamızda tek bir OXA-48 izolatının kaçırılmış olması, OXA-48 benzeri karbapenemazların düşük hidrolitik aktivite göstermesi ve bu nedenle bazı izolatlarda temosilin zon çapının sınırda veya eşik üzerinde kalabilmesi ile açıklanabilir. Literatürde de özellikle düşük ekspresyonlu OXA-48 varyantlarında fenotipik testlerin duyarlılığının azalabildiği ve sınıf D karbapenemazların zaman zaman kaçırılabildiği bildirilmektedir (42).

Ambler sınıf B (MBL) pozitif izolatlarda KDT'nin performansı hem bu çalışmada hem de literatürde OXA-48'e kıyasla daha sınırlıdır. Çalışmamızda NDM

tek gen pozitifliği saptanan izolatlarda KDT duyarlılığı %94,1 olarak hesaplanmıştır. KDT ile tespit edilemeyen bir izolatta MEM–MEM+EDTA zon farkının 3 mm olarak ölçülmesi inhibisyon varlığına rağmen üretici eşik değerinin (<5 mm) altında olduğundan negatif olarak değerlendirilmiştir. Van Dijk ve ark.'nın çalışmasında da MBL saptanmasında duyarlılık %90 (28/31) olarak bildirilmiş; özellikle bazı IMP ve NDM varyantlarında EDTA ile zon artışının sınırlı kalabildiği ve bu durumun yanlış negatif sonuçlara neden olabileceği vurgulanmıştır (99). Bu bulgular, MBL tespitinde zon farkına dayalı katı eşiklerin duyarlılığı düşürebileceğini göstermektedir.

Temosilin direncinin OXA-48 geni yanında Ambler Sınıf A ve B izolatlarında da görülebilmesi yapılan çalışmalarda önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Çakar ve ark., MBL pozitif izolatların %53'ünde temosilin zon çapının <12 mm olduğunu, Sattler ve ark. ise Ambler Sınıf A ve B izolatlarının yaklaşık %70'inde temosilin direnci saptandığını raporlamıştır. Bu durum, temosilinin özgüllüğünü belirgin şekilde azaltmaktadır. Ticari kitlerin önerileri doğrultusunda temosilinin yalnızca inhibitör sinerjisi saptanmadığı durumlarda değerlendirilmesi, yalancı pozitif OXA-48 yorumlarını azaltmayı amaçlamaktadır. Ancak bu yaklaşım, OXA-48 tek gen pozitifliğinde duyarlılığın artmasını sağlarken OXA-48'in yer aldığı ikili gen birlikteliği olan izolatlarda OXA-48'in gözden kaçmasına yol açmaktadır. Çalışmamızda OXA-48 ve NDM birlikteliği saptanan 7 izolattan yalnızca 4'ü KDT ile doğru tanımlanarak duyarlılığı %57,1 bulunmuştur. Doğru tanımlama, kit önerilerinin dışına çıkılarak EDTA ile sinerji görülmesine rağmen temosilin diskinin değerlendirilmesi ile mümkün olmuştur. Diğer üç izolatta ise EDTA ile sinerji saptanmaması nedeniyle temosilin diski direnci değerlendirilerek hatalı olarak OXA-48 tek gen pozitifliği şeklinde sonuçlandırılmıştır. Van Dijk ve ark. da fenotipik algoritmaların çoklu karbapenem direnç gen pozitifliği olan izolatlarda sınırlı kaldığını ve özellikle OXA-48 ve MBL birlikteliğinin doğru tanımlanamadığını vurgulamıştır (99). Bu bulgular, ticari kit algoritmalarının esas olarak tek gen pozitifliği için optimize edildiğini ve çoklu gen pozitifliği söz konusu olduğunda duyarlılığın belirgin şekilde azaldığını göstermektedir.

Çalışmamızda karbapenemaz saptanmasında fenotipik yöntem olarak Liofilchem KDT sonuçları literatürle uyumlu şekilde yüksek duyarlılık göstermiştir. Ancak temosilin diskinin hem Ambler Sınıf B izolatlarında hem de karbapenemaz

negatif izolatlarda hatalı sonuçlara yol açabilmesi özgüllüğü azaltan temel faktör olarak öne çıkmaktadır. Ayrıca ticari kitlerin önerdiği yorum algoritmaları, çoklu karbapenem direnci gen pozitifliği olan izolatlarda duyarlılığın belirgin şekilde düşmesine yol açabilmektedir. Bu nedenle, özellikle OXA-48'in yer aldığı çoklu gen pozitifliği şüphesi olan izolatlarda fenotipik test sonuçlarının moleküler yöntemlerle desteklenmesi gereklidir.

Karbapenemaz üreten izolatlarda karbapenemlerin etkinliğinin azalması, klinikte KDE enfeksiyonlarının tevavisinde başvurulabilecek alternatif antibiyotik seçeneklerinin önemini artırmaktadır. Karbapenemaz üretimine bağlı görülen antimikrobiyal dirençte en sık karşılaşılan karbapenemaz tipleri KPC, NDM, OXA-48, IMP ve VIM olup, her biri farklı antibiyotik gruplarına karşı değişen direnç profilleri sergilediğinden tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır (43,50). Çalışmada, karbapenemaz üretimi saptanan *E. coli* izolatlarında tedavi seçenekleri arasında yer alan kolistin, seftazidim-avibaktam, tigesiklin ve fosfomisin gibi alternatif antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi tedavinin yönlendirilebilmesi açısından gerekli görülmüştür.

Litaratürde karşılaştırma çalışmalarının önemli bir kısmı, ağırlıklı olarak *K. pneumoniae* ve diğer dirençli *Enterobacterales* türleri üzerinde yürütülmüştür. Bu türlerde tigesiklin için disk difüzyon yöntemi EUCAST tarafından önerilmemektedir. EUCAST *E. coli* izolatlarında tigesiklin duyarlılığının belirlenmesi için disk difüzyon yönteminin teknik olarak uygulanabilir olduğunu belirtmektedir. Bununla birlikte, farklı karşılaştırmalı çalışmalarda disk difüzyon yönteminin özellikle dirençli *Enterobacterales* izolatlarında MİK tabanlı yöntemlerle her zaman tam uyum göstermediği; bazı durumlarda disk difüzyon yöntemi ile duyarlılığın olduğundan yüksek raporlanabildiği bildirilmiştir (100,101). Buna karşılık tigesiklin duyarlılığının belirlenmesinde gradyent test, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleri arasında daha yüksek uyum saptandığı raporlanmıştır (102). Bu veriler, tigesiklin duyarlılık sonuçlarının yorumlanmasında kullanılan yöntemin ve bakteri türünün dikkate alınması gerektiğini göstermektedir.

Bu çalışmada karbapenemaz pozitif 104 *E. coli* izolatında disk difüzyon ile tigesiklin duyarlılığı %99 olarak bulunmuştur. Yalnızca NDM pozitif bir *E. coli* izolatında dirençli saptanarak NDM genine sahip izolatlarda tigesiklin duyarlılığı

%94,1 olarak belirlenmiştir. Tigesiklin duyarlılığı gradyent test ile MİK değerleri dikkate alınarak değerlendirildiğinde duyarlılığı %85,6 bulunmuştur. EUCAST *E. coli* izolatları için tigesiklin disk difüzyon klinik eşik değeri bildirmesine rağmen, bu çalışmada disk difüzyon ile duyarlı olarak saptanan 14 izolatın gradiyent test ile dirençli olarak saptanması literatürde görüldüğü gibi *E.* coli'lerde de yöntemler arasında uyumsuzlukların ortaya çıkabileceğini göstermiştir. Bu nedenle tigesiklin duyarlılığı için EUCAST tarafından taze hazırlanmış besiyerinin kullanıldığı sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak sonuç verilmesi önemlidir. Uygulama kolaylığı nedeniyle diğer duyarlılık metodları ile çalışıldığında her ne kadar literatürde uyumlu oldukları bildirilmesine rağmen tigesiklin duyarlılığı yorumlanırken, özellikle direnç profili yüksek *E. coli* izolatlarında sonuçların kullanılan teste bağlı olarak sınırlı ölçüde değişebileceği dikkate alınmalı ve duyarlılık sonuçları klinik bulgularla birlikte değerlendirilmelidir.

EUCAST yalnızca komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan oral fosfomisinin duyarlılığının belirlenmesinde disk difüzyon yönteminin kullanılabileceğini belirtmektedir. Çalışmamızda idrar örneklerinden izole edilen karbapenemaz pozitif *E.coli* izolatlarında literatürle uyumlu olarak fosfomisin duyarlılığı %96,2 (75/78) olmak üzere yüksek saptanmıştır. Karbapenem direnç genlerine göre değerlendirildiğinde en yüksek fosfomisin duyarlılığının OXA-48 pozitif izolatlarda (55/56, %98,2) olduğu saptanmış ve NDM pozitif izolatlarda ise %85,7 (12/14) olarak bulunmuştur. Erdem ve arkadaşları, toplum kökenli alt üriner sistem enfeksiyonu olan kadın hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarında fosfomisin duyarlılığını %94,5 olarak raporlamıştır (103). ESBL pozitif *E. coli* idrar izolatlarını değerlendiren Eroğlu ve arkadaşları fosfomisin direncini %14,3 (yaklaşık %85,7 duyarlılık) olarak bildirmiştir (104). Coşkun ve arkadaşları ESBL pozitif *E. coli* izolatlarında fosfomisin duyarlılığını %98 olarak raporlamıştır (105). Amladi ve arkadaşları ise idrar kökenli *E. coli* izolatlarında fosfomisin için %98,9 duyarlılık oranı bildirmiştir (106). Karbapenemaz pozitif izolatlarda fosfomisin duyarlılığı daha çok *K. pneumoniae* izolatlarını içeren *Enterobacterales* türlerinde araştırılmış ve bu nedenle *E. coli* odaklı ve ESBL ağırlıklı serilere kıyasla daha düşük bildirilmiştir (44,45). EUCAST tarafından özellikle komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* izolatlarının tedavisinde kullanılması önerilen bu

ajanın, uygun klinik koşullar sağlandığında karbapenemaz üreten izolatlar için de önemli tedavi seçenekleri arasında yer alabileceğini göstermektedir.

Karbapenemaz üreten izolatların tedavisinde önerilen alternatif seçeneklerden biri olan kolistin duyarlılığı laboratuvarın teknik kısıtlılıkları nedeniyle tüm izolatlarda referans yöntem olan sıvı mikrodilüsyon ile yürütülememiştir. Bu nedenle tüm izolatların kolistin duyarlılığı, CLSI tarafından önerilen (69) ve literatürde sıvı mikrodilüsyon ile yüksek kategorik uyum gösterdiği bildirilen sıvı disk elüsyon yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir (46,47). Karbapenemaz pozitif izolatların tamamı disk elüsyon testi ile kolistine duyarlı bulunmuştur. Çalışmamızda iki NDM, üç OXA-48 ve bir KPC genine sahip 6 izolatın kolistin duyarlılık testi sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile çalışılarak tekrarlanmış ve disk elüsyon sonuçları ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Kolistin duyarlılık sonuçları karbapenemaz üreticisi *E. coli* izolatlarında kolistinin in vitro etkinliğinin korunduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda seftazidim avibaktam duyarlılığı Ambler Sınıf B (MBL) izolatlarında etkinliğinin sınırlı olması nedeniyle çalışılmamıştır. OXA-48 pozitif 78 izolat ile KPC pozitif bir izolatın tamamı seftazidim avibaktama duyarlı olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada seftazidim-avibaktam ile kolistin için bulunan %100 duyarlılık sonucu OXA-48 endemisinin görüldüğü Türkiye gibi coğrafyalarda bildirilen bazı çalışmalarla kısmen uyumlu, kısmen ise daha yüksek bir duyarlılık profiline işaret etmektedir. Özgen ve arkadaşları tarafından OXA-48 ve KPC üreten *Enterobacterales* izolatlarında yapılan çalışmada seftazidim-avibaktam duyarlılığı %95,2 olarak bildirilmiş ve kolistin dirençli izolatlarda dahi seftazidim-avibaktamın yüksek oranda duyarlı kaldığını göstermiştir (107). Buna karşılık, Tüzemen ve ark.'nın karbapenem dirençli *K.pneumoniae* odaklı çalışmasında seftazidim-avibaktam duyarlılığını %89,1, kolistin duyarlılığını ise yalnızca %16,4 olarak bildirilmiş ve özellikle kolistin için belirgin bir etkinlik kaybı olduğunu vurgulamıştır (108). Çalışmamızda karbapenem dirençli *E. coli* izolatlarında her iki antibiyotiğe karşı %100 duyarlılık saptanmış olması, tür dağılımının ve merkezler arası antibiyotik kullanım baskısının duyarlılık oranlarını belirgin şekilde etkileyebileceğini düşündürmektedir. Bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, seftazidim-avibaktamın OXA-48 baskın popülasyonlarda

yüksek oranda invitro etkinliğini koruduğu, kolistinin ise tür ve merkezlere göre değişken bir performans gösterdiği sonucunu göstermektedir.

Bu çalışmaya tek merkezden elde edilmiş çok sayıda karbapenem dirençli *E. coli* izolatının dahil edilmiş olmasına rağmen çalışma grubunda yer almayan *bla*IMP, *bla*VIM gibi genlere ait testlerin performansının değerlendirilememesi önemli bir kısıtlılık oluşturmaktadır. Ayrıca retrospektif seçilen izolatlara ait veriler olduğundan hasta yönetimine katkısı da değerlendirilememiştir. Çalışma izolatlarının seçiminde karbapenem duyarlılıklarının belirlenmesinde referans yöntem sıvı mikrodilüsyon yönteminin kullanılmaması bir kısıtlılık olarak görülmektedir. Bununla birlikte; çalışmada düşük düzey karbapenemaz üretiminde hatalı sonuçlar görülebildiği bildirilen ancak rutin uygulamalarda sık kullanım yeri bulan otomatize sistemden elde edilen MİK değerlerinin kullanılmasının rutin pratik uygulamalarda karşılaşılabilecek sorunların aydınlatılması açısından yararlı olabileceği düşünülmüştür.

PZR ile karbapenemaz negatif bulunan *E. coli* izolatlarında ertapenem MİK değerinin artmasına neden olabilecek porin kaybı, effluks artışı, GSBL/AmpC birlikteliği gibi karbapenemaz dışı mekanizmalar bu çalışma kapsamında ayrıntılı olarak gösterilememiştir. Ayrıca genotipik doğrulamada kullanılan multipleks PZR paneli hedef genlerle sınırlı olduğundan panel dışı kalabilecek nadir genler ve direnç mekanizmaları da tamamen dışlanamamıştır.

Çalışmada altın standart referans yöntem olarak kabul edilen PZR yanında CLSI ve EUCAST tarafından da karbapenemaz doğrulamasında önerilen yöntem olan mCIM testi ile literatürde az sayıda çalışma olan ve kolay uygulanabilirliği, maliyet etkin olması, görece hızlı (5-6 saat) ve zon çaplarının değerlendirilmesine dayalı kolay yorumlanabilir bir test olan rCDM'nin performansının karşılaştırılması literatüre katkı sağlayacaktır. rCDM testinin uygulama ve yorumlamadaki avantajlarına rağmen düşük hidrolitik aktiviteye sahip OXA-48 gibi izolatlarda duyarlılığının azalması nedeniyle testin uygulamasında kullanılacak besiyeri kalınlığının, test diskine sürülecek inokulum miktarının, test diskinin yüzeyine homojen dağıtılmasının ve zon çaplarının değerlendirilmesinin dikkatle yapılması önemlidir. Uyumsuz sonuçların klinik ve epidemiyolojik şüphe varlığında ek fenotipik veya genotipik testler ile doğrulanması gerekmektedir.

Karbapenemaz üretiminin hızlı ve güvenilir tespiti, antibiyotik direncinin önlenmesinde tedavi stratejilerinin erken belirlenmesi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin kolay uygulanmasına neden olmaktadır. Literatürde performansı iyi tanımlanan fenotipik yöntem olan mCIM yanında duyarlılığı yüksek, hızlı, kolay uygulanabilir ve yorumlanabilir düşük maliyetli bir yöntem olarak saptanan rCDM'in de, moleküler test yöntemleri altyapısı olmayan laboratuvarlarda yalnızca temel laboratuvar ekipmanı gerektirdiğinden karbapenemaz tipinin belirlenmesinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ

Bu çalışmada, EUCAST tarafından karbapenemaz üretiminin saptanabilmesi için önerilen karbapenem tarama kriterlerini karşılayan *E.coli* izolatlarında karbapenemaz üretimi altın standart yöntem olan genotipik PZR yöntemi ile çalışılarak belirlenmiş ve fenotipik testlerin tanısal performansları karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, karbapenemaz üretiminin tek başına karbapenem direnç düzeyi ile her zaman paralel olmadığını, karbapenemaz saptanması için şüpheli izolatların EUCAST tarama kriterlerine uyularak değerlendirilmesi gerektiğini ve özellikle düşük hidrolitik aktivite gösteren karbapenem direnç genlerinin doğru tanımlanabilmesi için çoklu yaklaşımın gerekli olduğunu göstermiştir.

Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında OXA-48 geninin baskın olduğu saptanmıştır. OXA-48 pozitif saptanan izolatların hem poliklinik hem de servis hasta örneklerinden izole edilmesi, bu genin yalnızca hastane kaynaklı enfeksiyonlarla sınırlı kalmadığını toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da etken olarak görülebileceği göstermektedir. Bu nedenle özellikle düşük hidrolitik aktivitesi nedeniyle her zaman yüksek MİK değerleri gösteremeyen izolatlarda karbapenem duyarlılıklarının sadece klinik eşik değerlerine göre değil tarama eşik değerlerine göre de değerlendirilmesi ve dikkatle izlenmesi gerektiğini düşündürmektedir. Daha çok servislerde yatan hastalarda sağlık bakımı ilişkili enfeksiyon etkeni olarak izole edilen NDM pozitif *E. coli* izolatlarının klinik yönetim ve enfeksiyon kontrolü açısından daha yüksek riskli hasta gruplarında önem kazandığını göstermektedir. Bu durum, özellikle servis ve yoğun bakım ilişkili olgularda karbapenemaz üretiminin hızlı tespiti ve izolasyon önlemlerinin gecikmeden uygulanmasının gerekliliğini desteklemektedir.

OXA-48 geninin baskın olduğu karbapenemaz pozitif *E. coli* izolatlarında meropeneme kıyasla ertapenemin taramada daha duyarlı bir gösterge olduğu gösterilmiştir. Meropenem MİK değerlerinin tarama eşik değerlerinden düşük ve zon çaplarının tarama eşik değerlerinden geniş seyrettiği izolatlarda dahi ertapenemin tarama kriterlerini karşılayabilmesi, özgüllüğü daha düşük olsa bile karbapenemazı kaçırmamak açısından kritik bir tarama ajanı olduğunu göstermiştir. Türkiye gibi OXA-48'in baskın görüldüğü coğrafyalarda tarama stratejisinde meropenem yanında

ertapenemin kullanılmasının karbapenemaz tespitinde duyarlılığı arttıracağı görülmüştür.

Karbapenemaz tespitinde fenotipik doğrulama testlerinden olan mCIM, karbapenemaz üretiminin gösterilmesinde uygulanabilir ve standardize bir yöntem olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte mCIM'nin sonuç verme süresinin görece uzun olması klinik karar süreçlerinde gecikmeye neden olabilecek bir dezavantaj olarak öne çıkmaktadır. Bu nedenle mCIM rutin akışta güvenilir bir doğrulama testi olmakla birlikte, hızlı sonuç gerektiren durumlarda daha kısa sürede yanıt veren yöntemlerle birlikte kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür.

Çalışmamızda uygulanan fenotipik yöntemlerden rCDM, referans yöntem olan PZR ile karşılaştırıldığında genel olarak yüksek tanısal doğruluk göstermiştir. Testin kısa sürede sonuç verebilmesi, hızlı karar verilmesi gereken durumlarda karbapenemaz üretiminin erken öngörülmesine ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin gecikmeden başlatılmasına katkı sağlayabilecek önemli bir avantaj olarak değerlendirilmektedir. Bununla birlikte, yanlış negatif sonuçların OXA-48 alt tipinde daha belirgin izlenmesi, düşük düzey karbapenemaz aktivitesi bulunan izolatlarda rCDM duyarlılığının azalabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle rCDM sonuçlarının dikkatle yorumlanması; klinik şüphe veya laboratuvar bulguları ile uyumsuzluk saptanan izolatlarda ek fenotipik doğrulama testleri ile değerlendirme yapılması ve gerekli görülen durumlarda genotipik yöntemlerle doğrulanması uygun olacaktır.

Kombinasyon disk testi karbapenemaz üretiminin saptanması yanında fenotipik olarak karbapenemaz tipinin de tespitine olanak sağlayan ve genotipik sınıflandırmaya alternatif olarak kullanılabilen bir yöntemdir. Bu testin klasik disk difüzyon yöntemine benzer şekilde uygulanabilmesi ve genotipik yöntemlere kıyasla nispeten daha düşük maliyetli olması rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında uygulanabilirliğini arttırmaktadır. Ancak değerlendirme aşamasında, OXA-48 genine sahip izolatların tanımlanmasında kullanılan temosilin diski direncinin karbapenemaz dışı farklı direnç mekanizmaları ile de görülebildiği bilinmektedir. KDT'de temosilin direncinin tek başına yorumlanması durumunda OXA-48 lehine hatalı sınıflandırma riskini artırabilmektedir. Bu nedenle KDT sonuçlarının mümkün olduğunda rCDM veya mCIM gibi karbapenemaz üretimini destekleyen fenotipik testlerle birlikte

değerlendirilmesi ve testler arasında uyumsuzluk görüldüğünde genotipik yöntemlerle doğrulanması tanısal güvenilirliği artıracaktır.

Karbapenemaz pozitif *E. coli* izolatlarında kolistin, fosfomisin ve tigesiklinin yüksek oranda duyarlı bulunması; bu ajanların hastalarda alternatif tedavi seçenekleri arasında değerlendirilebileceğini göstermiştir. Ayrıca MBL dışı karbapenemazlarda seftazidim-avibaktamın yüksek duyarlılık göstermesi, uygun klinik endikasyonlarda bu ajanın da tedavi yönetiminde etkili bir seçenek olabileceğini düşündürmektedir.

Sonuç olarak, karbapenemaz üreten *E. coli* izolatlarının saptanmasında rCDM, mCIM ve KDT gibi fenotipik yöntemler rutin laboratuvar pratiğinde uygulanabilir ve güçlü bir seçenek olarak görülmektedir. Ancak özellikle düşük düzey fenotipik direnç gösterebilen OXA-48 gibi genlerde yanlış negatiflik olasılığı göz önünde bulundurularak şüpheli izolatlarda genotipik doğrulama ile birlikte çoklu yaklaşım benimsenmelidir. Bu yaklaşımın hem klinik yönetimi hızlandıracağı hem de dirençli izolatların yayılımını önlemeye yönelik enfeksiyon kontrol stratejilerine katkı sağlayacağı kanaatine varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. Global antimicrobial resistance and use surveillance system (GLASS) report 2022 [Internet]. Geneva; 2022. [cited 2025 Sept 19]. Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702

2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Ninth edition. Edinburg London New York Osford Philadelphia St. Louis Sydney: Elsevier; 2021. 855 p.

3. Tängdén T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing E nterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. J Intern Med. 2015 May;277(5):501–12.

4. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) 2022 National Healthcare Safety Network (NHSN) Antimicrobial Use and Resistance (AUR) Module Data Summary Option Report. 2022; [Internet]. Atlanta: CDC; 2023 [cited 2025 Sept 19]. Option Report. 2022; Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/datastat/aur-reports.html

5. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β-Lactamases: a Clinical Update. Clin Microbiol Rev. 2005;18(4):657–86.

6. Tamma PD, Goodman KE, Harris AD, Tekle T, Roberts A, Taiwo A, et al. Comparing the Outcomes of Patients With Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Bacteremia. Clin Infect Dis. 2017 Feb 1;64(3):257–64.

7. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011 Oct;17(10):1791–8.

8. World Health Organization. WHO Bacterial priority pathogens list 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2024. [cited 2025 Sept 19]. (WHO Bacterial Priority Pathogens List). Available from: https://www.who.int/publications/i/item/9789240080645

9. European Centre for Disease Prevention and Control.(ECDC), World Health Organization (WHO). Regional Office for Europe. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023:

2021 data. [Internet]. Stockholm: ECDC; 2023 [cited 2025 Sept 19]. Available from: https://data.europa.eu/doi/10.2900/63495

10. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. J Infect Dis. 2017 Feb 15;215(suppl_1):S28–36.

11. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Detection of resistance mechanisms [Internet]. Växjö, Sweden; 2017 . [cited 2025 Sept 19]. Available from: https://www.eucast.org/resistance_mechanisms/

12. Kamel NA, Tohamy ST, Yahia IS, Aboshanab KM. Insights on the performance of phenotypic tests versus genotypic tests for the detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli in resource-limited settings. BMC Microbiol. 2022 Oct 14;22(1):248.

13. Ryan KJ, editor. Sherris Medical Microbiology. 7th ed. New York, N.Y: McGraw-Hill Education LLC; 2018. (McGraw-Hill's AccessMedicine).

14. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 1998 Jan;11(1):142–201.

15. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. 2004 Feb;2(2):123–40.

16. Tille PM. Bailey & Scott's diagnostic microbiology. Fourteenth edition. St. Louis, Missouri: Elsevier; 2017.

17. Patel R. MALDI-TOF Mass Spectrometry: Transformative Proteomics for Clinical Microbiology. Clin Chem. 2013 Feb 1;59(2):340–2.

18. Carroll KC, Pfaller MA, Landry ML, McAdam AJ, Patel R, Richter SS, et al., editors. Manual of clinical microbiology. 12th edition. Washington, DC: ASM Press; 2019.

19. Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, et al. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. Clin Infect Dis. 2011 Mar 1;52(5):e103–20.

20. Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis. 2008 Mar;8(3):159–66.

21. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, Van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America 2023 Guidance on the Treatment of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Infections. Clin Infect Dis. 2023 July 18;ciad428.

22. Bush K, Bradford PA. β-Lactams and β-Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016 Aug;6(8):a025247.

23. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S. The Bacterial Cell Envelope. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010 May 1;2(5):a000414–a000414.

24. Drawz SM, Bonomo RA. Three Decades of β-Lactamase Inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan;23(1):160–201.

25. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. Kudva IT, Zhang Q, editors. Microbiol Spectr. 2016 Mar 25;4(2):4.2.15.

26. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. 1940. Rev Infect Dis. 1988;10(4):677–8.

27. The structure of β-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980 May 16;289(1036):321–31.

28. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of β-Lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):969–76.

29. Jacoby GA. AmpC β-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):161–82.

30. Tamma PD, Doi Y, Bonomo RA, Johnson JK, Simner PJ, Antibacterial Resistance Leadership Group, et al. A Primer on AmpC β-Lactamases: Necessary Knowledge for an Increasingly Multidrug-resistant World. Clin Infect Dis. 2019 Sept 27;69(8):1446–55.

31. Bradford PA. Extended-Spectrum β-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct;14(4):933–51.

32. Cantón R, Coque TM. The CTX-M β-lactamase pandemic. Curr Opin Microbiol. 2006 Oct;9(5):466–75.

33. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-β-Lactamases: the Quiet before the Storm? Clin Microbiol Rev. 2005 Apr;18(2):306–25.

34. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov;55(11):4943–60.

35. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile β-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007 July;20(3):440–58.

36. Ma J, Song X, Li M, Yu Z, Cheng W, Yu Z, et al. Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. Microbiol Res. 2023 Jan;266:127249.

37. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):1151–61.

38. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a New Metallo-β-Lactamase Gene, $bla_{\text{NDM-1}}$, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Dec;53(12):5046–54.

39. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae Now in Turkey. Antimicrob Agents Chemother. 2012 May;56(5):2784–5.

40. Evans BA, Amyes SGB. OXA β-Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2014 Apr;27(2):241–63.

41. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in Acinetobacter baumannii: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2006 Sept;12(9):826–36.

42. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother. 2012 July 1;67(7):1597–606.

43. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and Other Enterobacteriaceae: an Evolving Crisis of Global Dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct;25(4):682–707.

44. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019 [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention (U.S.); 2019 Nov [cited 2025 Oct 20]. Available from: https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532

45. European Survet on Carbapenemase-Producing (EU-SCAPE) Working Group. Project Consortium. European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacterales (EU-SCAPE):

Final Integrated Report, 2020 Dataset. Europe: European Survey on Carbapenemase-Producing Enterobacterales (EU-SCAPE); 2020.

46. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kılıç S, et al. Türkiye'de 2019 Yılı İçinde İzole Edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Karbapenemaz Epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul. 2021 Jan 27;55(1):1–16.

47. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual epidemiological report for 2024. Stockholm: ECDC; 2024.

48. Alvisi G, Curtoni A, Fonnesu R, Piazza A, Signoretto C, Piccinini G, et al. Epidemiology and Genetic Traits of Carbapenemase-Producing Enterobacterales: A Global Threat to Human Health. Antibiot Basel Switz. 2025 Feb 1;14(2):141.

49. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü MRL ve BÜDB. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (UAMDS) Ağı 2022–2023 Yıllık Raporu [Internet]. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2025.; [cited 2025 Oct 20]. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/mikrobiyoloji-referans-laboratuvarlari-ve-biyolojik-urunler-db/Dokumanlar/Raporlar/UAMDS_2022-2023_Yillik_Raporu.pdf

50. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence. 2017 May 19;8(4):460–9.

51. Falcone M, Daikos GL, Tiseo G, Bassoulis D, Giordano C, Galfo V, et al. Efficacy of Ceftazidime-avibactam Plus Aztreonam in Patients With Bloodstream Infections Caused by Metallo-β-lactamase-Producing Enterobacterales. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 2021 June 1;72(11):1871–8.

52. Sader HS, Mendes RE, Kimbrough JH, Hubler CM, Castanheira M. Activity of Aztreonam/Avibactam and Recently Approved β-Lactamase Inhibitor Combinations against Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa from Intensive Care Unit and Non-Intensive Care Unit Patients. Antibiot Basel Switz. 2024 June 17;13(6):564.

53. Malisova L, Vrbova I, Pomorska K, Jakubu V, Zemlickova H. In Vitro Activity of Cefiderocol Against Carbapenem-Resistant Enterobacterales and Pseudomonas aeruginosa. Microb Drug Resist Larchmt N. 2023 Oct;29(10):485–91.

54. Van Loon K, Voor In 'T Holt AF, Vos MC. A Systematic Review and Meta-analyses of the Clinical Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Jan;62(1):e01730-17.

55. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. Clin Infect Dis. 2019 Nov 13;69(Supplement_7):S521–8.

56. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2012 Sept;18(9):1503–7.

57. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. Rohde H, editor. PLOS ONE. 2015 Mar 23;10(3):e0123690.

58. Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28th ed. CLSI supplement M100 Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

59. Li J, Li C, Cai X, Shi J, Feng L, Tang K, et al. Performance of modified carbapenem inactivation method and inhibitor-based combined disk test in the detection and distinguishing of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Ann Transl Med. 2019 Oct;7(20):566–566.

60. Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. J Clin Microbiol. 2011 Sept;49(9):3321–4.

61. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2018 Apr 1;73(4):909–15.

62. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, et al. Comparative Evaluation of a Prototype Chromogenic Medium (ChromID CARBA) for Detecting Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Surveillance Rectal Swabs. J Clin Microbiol. 2012 June;50(6):1841–6.

63. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2013 Mar 1;68(3):487–9.

64. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? Virulence. 2017 May 19;8(4):417–26.

65. Ozyurt OK, Cetinkaya O, Ozhak B, Ongut G, Turhan O, Yazisiz H, et al. Evaluation of the BD Phoenix CPO Detect Test for the Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacterales. Future Microbiol. 2023 May;18(7):399–405.

66. Rabaan AA, Eljaaly K, Alhumaid S, Albayat H, Al-Adsani W, Sabour AA, et al. An Overview on Phenotypic and Genotypic Characterisation of Carbapenem-Resistant Enterobacterales. Med Kaunas Lith. 2022 Nov 19;58(11):1675.

67. Vamsi SK, Moorthy RS, Hemiliamma MN, Chandra Reddy RB, Chanderakant DJ, Sirikonda S. Phenotypic and genotypic detection of carbapenemase production among gram negative bacteria isolated from hospital acquired infections. Saudi Med J. 2022 Mar;43(3):236–43.

68. Caliskan-Aydogan O, Alocilja EC. A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. Microorganisms. 2023 June 3;11(6):1491.

69. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 35th ed. CLSI supplement M100Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025.

70. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), Version 13.0. EUCAST Disk Diffusion Method [Internet]. Basel, Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID); 2025 Jan. (Antimicrobial Susceptibility Testing). [cited 2025 Oct 20].Available from: https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/

71. Jing X, Min X, Zhang X, Gong L, Wu T, Sun R, et al. The Rapid Carbapenemase Detection Method (rCDM) for Rapid and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa. Front Cell Infect Microbiol. 2019 Nov 6;9:371.

72. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) EUCAST Clinical Breakpoint Tables v.15.0 (2025) [Internet]. 2025 [cited 2025 Sept 21]. Available from: https://www.eucast.org/clinical_breakpoints

73. Simner PJ, Bergman Y, Trejo M, Roberts AA, Marayan R, Tekle T, et al. Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli. J Clin Microbiol. 2019;57(11):e01163-18.

74. Trevethan R. Sensitivity, Specificity, and Predictive Values: Foundations, Pliabilities, and Pitfalls in Research and Practice. Front Public Health. 2017 Nov 20;5:307.

75. IBM Corp (2019) IBM SPSS Statistics for Windows. Version 26.0, IBM Corp, Armonk, NY. Available from: https://www.ibm.com/products/spss-statistics

76. Tato M, Coque TM, Rucz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, et al. Complex Clonal and Plasmid Epidemiology in the First Outbreak of Enterobacteriaceae Infection Involving VIM-1 Metallo- -Lactamase in Spain: Toward Endemicity? Clin Infect Dis. 2007 Nov 1;45(9):1171–8.

77. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Clin Microbiol Infect. 2012 May;18(5):432–8.

78. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Öğünç D, Özhak Baysan B, et al. Investigation of Carbapenemases in Carbapenem-Resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Strains Isolated in 2014 in Turkey. Mikrobiyol Bul. 2016 Jan 7;50(1):21–33.

79. Hayran O. BİLİM İLETİŞİMİNDE ÖNEMLİ BİR ARAÇ: 4-GÖZLÜ TABLO. Eskişeh Türk Dünya Uygul Ve Araşt Merk Halk Sağlığı Derg. 2025 Feb 4;10(1):105–15.

80. Karlowsky JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, et al. *In Vitro* Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. Munson E, editor. J Clin Microbiol. 2017 June;55(6):1638–49.

81. de Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Sahm DF, Nichols WW. In Vitro Susceptibility to Ceftazidime-Avibactam of Carbapenem-Nonsusceptible Enterobacteriaceae Isolates Collected during the INFORM Global Surveillance Study (2012 to 2014). Antimicrob Agents Chemother. 2016 May;60(5):3163–9.

82. Kazmierczak KM, Karlowsky JA, De Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible *Enterobacterales* Collected as Part of a Global Surveillance Program, 2012 to 2017. Antimicrob Agents Chemother. 2021 June 17;65(7):e02000-20.

83. Wise MG, Karlowsky JA, Mohamed N, Hermsen ED, Kamat S, Townsend A, et al. Global trends in carbapenem- and difficult-to-treat-resistance among World Health Organization priority bacterial pathogens: ATLAS surveillance program 2018–2022. J Glob Antimicrob Resist. 2024 June;37:168–75.

84. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), World Health Organization RO for E (WHO/Europe). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023 – 2021 data [Internet]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. Report No.: 2363–2666. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2023-2021-data

85. Temkin E, Bechor M, Lurie-Weinberger MN, Keren-Paz A, Chen D, Lugassy C, et al. Population-Based Study of Emergence and Spread of– *Escherichia coli* Producing OXA-48–Like Carbapenemases, Israel, 2007–2023. Emerg Infect Dis [Internet]. 2025 Jan [cited 2026 Jan 8];31(1): 66-74. Available from: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/31/1/24-0722_article

86. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria. BioMed Res Int. 2014;2014:1–12.

87. Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. Am J Med. 2002 July;113(1):5–13.

88. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. Clin Microbiol Rev. 2019 Dec 18;33(1):e00102-19.

89. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a New Phenotypic OXA-48 Disk Test for Differentiation of OXA-48 Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Clinical Isolates. Bourbeau P, editor. J Clin Microbiol. 2015 Apr;53(4):1245–51.

90. Amar M, Shalom O, Adler A. Comparative evaluation of a new commercial media, the CHROMAgar™ mSuperCARBA™, for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017 May;88(1):20–2.

91. Fuchs F, Ahmadzada A, Plambeck L, Wille T, Hamprecht A. Susceptibility of Clinical Enterobacterales Isolates With Common and Rare Carbapenemases to Mecillinam. Front Microbiol. 2021 Jan 12;11:627267.

92. Huang TD, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. J Antimicrob Chemother. 2014 Feb 1;69(2):445–50.

93. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011.

Eurosurveillance [Internet]. 2013 [cited 2026 Jan 11]; 18(31):pii=20549. Available online: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20549

94. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. Ledeboer NA, editor. J Clin Microbiol. 2017 Aug;55(8):2321–33.

95. Tamma PD, Opene BNA, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. Comparison of 11 Phenotypic Assays for Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. Bourbeau P, editor. J Clin Microbiol. 2017 Apr;55(4):1046–55.

96. Çizmeci Z. Detection of Carbapenemase Production in Klebsiella pneumoniae Isolates by Rapid Carbapenemase Detection Method in an OXA-48 Endemic Region. Jundishapur J Microbiol [Internet]. 2024 June 30 [cited 2025 Dec 10];17(5): e146081 Available from: https://brieflands.com/journals/jjm/articles/146081

97. Çalık Ş, Kansak N, Aksaray S. Phenotypic detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant isolates with the rapid carbapenemase detection method (rCDM). J Microbiol Methods. 2022 Sept;200:106536.

98. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Systematic Comparison of Three Commercially Available Combination Disc Tests and the Zinc-Supplemented Carbapenem Inactivation Method (zCIM) for Carbapenemase Detection in *Enterobacterales* Isolates. Ledeboer NA, editor. J Clin Microbiol. 2021 Aug 18;59(9):e03140-20.

99. Van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC, 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 Apr;20(4):345–9.

100. Zhang J, Zhao C, Chen H, Wang X, Li H, Zhang Y, et al. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for Acinetobacter baumannii and Enterobacteriaceae. J Glob Antimicrob Resist. 2015 June;3(2):75–9.

101. Li H, Zhou M, Chen X, Zhang Y, Jian Z, Yan Q, et al. Comparative Evaluation of Seven Tigecycline Susceptibility Testing Methods for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Infect Drug Resist. 2021;14:1511–6.

102. Zarkotou O, Pournaras S, Altouvas G, Pitiriga V, Tziraki M, Mamali V, et al. Comparative evaluation of tigecycline susceptibility testing methods for expanded-spectrum

cephalosporin- and carbapenem-resistant gram-negative pathogens. J Clin Microbiol. 2012 Nov;50(11):3747–50.

103. Erdem I, Kara Ali R, Ardic E, Elbasan Omar S, Mutlu R, Topkaya AE. Community-acquired Lower Urinary Tract Infections: Etiology, Antimicrobial Resistance, and Treatment Results in Female Patients. J Glob Infect Dis. 2018;10(3):129–32.

104. Eroğlu A, Akduman Alaşehir E. Evaluation of Treatment Applications and Antibiotic Resistance Rates for Community Acquired Urinary Tract Infections in Turkey and a Review of the Literature. J Urol Surg. 2020 June 28;7(2):114–9.

105. Şay Coşkun US. Üriner Sistem İnfeksiyonlarına neden Olan Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Üreten Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae İzolatlarının Fosfomisin ve Nitrofurantoine Duyarlılıkları. J Contemp Med [Internet]. 2019 Mar 15 [cited 2025 Dec 9]; 55-58 .Available from: https://dergipark.org.tr/en/doi/10.16899/gopctd.450476

106. Amladi AU, Abirami B, Devi SM, Sudarsanam TD, Kandasamy S, Kekre N, et al. Susceptibility profile, resistance mechanisms & efficacy ratios of fosfomycin, nitrofurantoin & colistin for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae causing urinary tract infections. Indian J Med Res. 2019 Feb;149(2):185–91.

107. Ozger HS, Evren E, Yildiz SS, Erol C, Bayrakdar F, Azap O, et al. Ceftazidime – Avibactam susceptibility among carbapenem-resistant Enterobacterales in a pilot study in Turkey. Acta Microbiol Immunol Hung [Internet]. 2021 July 29 [cited 2026 Jan 11]; 256-261 Available from: https://akjournals.com/view/journals/030/aop/article-10.1556-030.2021.01525/article-10.1556-030.2021.01525.xml

108. Tüzemen NÜ, Önal U, Merdan O, Akca B, Ener B, Özakın C, et al. Synergistic antibacterial activity of ceftazidime–avibactam in combination with colistin, gentamicin, amikacin, and fosfomycin against carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae. Sci Rep. 2024 July 30;14(1):17567.