TC
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

KARBAPENEM DİRENÇLİ İZOLATLARDA (*KLEBSIELLA SPP.*, *ESCHERICHIA COLI*) HIZLI KARBAPENEMAZ TESPİT YÖNTEMİ (THE RAPID CARBAPENEMASE DETECTION METHOD, rCDM) İLE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN FENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI

Dr. Şeyma Çalık

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

TC
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

KARBAPENEM DİRENÇLİ İZOLATLARDA (*KLEBSIELLA SPP.*, *ESCHERICHIA COLI*) HIZLI KARBAPENEMAZ TESPİT YÖNTEMİ (THE RAPID CARBAPENEMASE DETECTION METHOD, rCDM) İLE KARBAPENEMAZ ÜRETİMİNİN FENOTİPİK OLARAK SAPTANMASI

Dr. Şeyma Çalık

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Sebahat Aksaray
Uzm. Dr. Nilgün Kansak

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2022

TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan, sadece eğitim alanında değil her anlamda daima destekçim olduğunu hissettiğim değerli hocam aynı zamanda tez danışmanım Prof. Dr. Sebahat Aksaray'a,

Hem eğitimim süresince hem de tez yapım ve yazım aşamasında bilgi ve tecrübesiyle her türlü desteği veren sevgili uzmanımız Dr. Nilgün Kansak'a, asistanlık eğitimim boyunca bilgilerini bizimle paylaşarak eğitimime katkı sağlayan başta Doç. Rıza Adaleti olmak üzere Dr. Müge Aslan, Dr. Neslihan Arıcı, Dr. Deniz Turan, Dr. Ferhat Aslan ve birlikte çalışma fırsatı bulduğum tüm uzmanlarımıza,

Asistanlık hayatım boyunca birlikte çalışmaktan zevk aldığım, bilgi ve tecrübelerini her daim paylaşan sevgili kıdemlilerim Dr. Gülden Aydın, Dr. Kübra Özhan, Dr. Nihan Yıldız ve Dr. Ezgi Akpınar'a, asistanlığımın son zamanlarında birlikte çalışma fırsatı bulduğumuz bu süreçte birlikte eğlenip yeri geldiğinde dertleştiğimiz sevgili göreve yeni başlayan asistan arkadaşlarıma ve şu an bizimle birlikte olmasalarda asistanlığımın ilk gününden bugüne benimle birlikte asistan odasında bulunmuş tüm arkadaşlarıma,

Araştırma-geliştirme çalışmaları kapsamında çalışmamızın destekleyicileri olan Bioeksen Ar Ge teknolojileri Ltd. Şti ve Labgen Laboratuvar Sistemleri San. ve Tic. A.Ş İstanbul şubelerine,

Hayatım boyunca aldığım her kararda yanımda olan, hiçbir koşulda desteklerini benden esirgemeyen annem, babam ve kardeşlerime,

En içten sevgi ve teşekkürlerimle…

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR ..... **i**

İÇİNDEKİLER ..... **ii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **v**

TABLO LİSTESİ ..... **vii**

ŞEKİL LİSTESİ ..... **viii**

ÖZET ..... **ix**

ABSTRACT ..... **xi**

1.GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2.GENEL BİLGİLER **2**

2.1.*Enterobacterales* 2

2.2.*Klebsiella pneumoniae* 3

2.2.1.Genel Bilgiler 3

2.2.2.Virülans Faktörleri 3

2.2.3.*Klebsiella pneumoniae'*nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar 4

2.2.4.Laboratuvar Tanısı 5

2.2.5.Antibiyotik Tedavisi ve Direnç Profili 6

2.3.*Escherichia coli* 7

2.3.1.Genel Bilgiler 7

2.3.2.Virülans Faktörleri 8

2.3.3.*Escherichia coli'*nin Neden Olduğu Klinik Tablolar 9

2.3.3.1.İntestinal Hastalıklar 9

2.3.3.2.Ekstraintestinal Hastalıklar 9

2.3.4.Laboratuvar Tanısı 10

2.3.5.Antibiyotik Tedavisi ve Direnç Profili 11

2.4.Beta Laktamazlar 12

2.4.1.Grup 1 Sefalosporinazlar 14

2.4.2.Grup 2 Serin β-Laktamazlar 15
2.4.2.1.Penisilinazlar 15
2.4.2.2.Geniş Spektrumlu Beta Laktamazlar 16
2.4.2.3.Karbapenemazlar 17
2.4.3.Grup 3 Metallo- β-Laktamazlar 19
2.5.Karbapenemaz Tespit Yöntemleri 20
2.5.1.Fenotipik Tespit Yöntemleri 21
2.5.1.1. Kombinasyon Disk Testi 21
2.5.1.2. Biyokimyasal (Kolorimetrik) Testler 22
2.5.1.3.Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi 22
2.5.1.4.Karbapenem Hidrolizinin Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi ile Saptanması 22
2.5.1.5. Lateral Akım Yöntemleri 23
2.5.2.Genotipik Tespit Yöntemleri 23
2.6.Karbapenemaz Tiplerinin Dağılımı 24
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER 26
3.1.Gereçler 26
3.1.1.Çalışmaya Alınan Örnekler 26
3.1.2.Kullanılan Besiyerleri ve Malzemeler 26
3.1.3.Kullanılan Cihaz ve Aletler 27
3.2.Yöntemler 27
3.2.1.Suşların Toplanması 27
3.2.2.İzolatların Hazırlanması 28
3.2.3.Besiyerlerinin Hazırlanması 28
3.2.4.İzolatlardan Genetik Materyalin Elde Edilmesi 29
3.2.4.1.Ekstraksiyon Test Prosedürü 29
3.2.5.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenem Direnç Genlerinin Saptanması 31
3.2.5.1.Polimeraz Zincir Reaksiyonu Test Prosedürü 31
3.2.5.2.Sonuçların Değerlendirilmesi 33

3.2.6.Hızlı Karbapenemaz Tespit Yönteminin Uygulanması 34
3.2.6.1.Test Prosedürü 34
3.2.6.2.Sonuçların Değerlendirilmesi 35
3.2.7.Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi 36
3.2.7.1.Test Prosedürü 36
3.2.7.2.Sonuçların Değerlendirilmesi 37
3.2.8.Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması 38
3.2.9.Test Performansının Değerlendirilmesi 38
4.BULGULAR 38
5.TARTIŞMA 45
6.SONUÇ VE ÖNERİLER 53
7.KAYNAKLAR 55

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	American Type Culture Collection
CarbaNP	Carbapenemase Nordmann-Poirel
CLSI	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
CIM	Karbapenem İnaktivasyon Metodu (Carbapenem Inactivation Method)
ÇİD	Çoklu İlaç Dirençli
DAEC	Diffüz adheran *Escherichia coli*
EAEC	Enteroagregatif *Escherichia coli*
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EHEC	Enterohemorajik *Escherichia coli*
EIEC	Enteroinvaziv *Escherichia coli*
EPEC	Enteropatojenik *Escherichia coli*
ETEC	Enterotoksijenik *Escherichia coli*
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
GES	Guiana extended-spectrum β-lactamase
GSBL	Geniş spektrumlu beta-laktamaz
IMI	Imipenem hydrolyzing β-lactamase

IMP	Imipenemase
KPC	*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
MALDI-TOF MS	Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (Matriks assisted lazer desorption ionization time of flight massspectrometry)
MBL	Metallo- β-laktamaz
mCIM	Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (Modified Carbapenem Inactivation Method)
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyon
NDM	New Delhi metallo-β-lactamase
NmcA	Not metalloenzyme carbapenemase
OXA	Oksasilinaz
PBA	Fenilboronik asit
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
rCDM	Hızlı Karbapenemaz Tespit Yöntemi (The Rapid Carbapenemase Detection Method)
rCIM	Hızlı Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi (Rapid Carbapenem Inactivation Method)
sCIM	Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi (The Simplified Carbapenem Inactivation Method)
Sme	Serratia marcescens enzyme
VIM	Verona integron-encoded metallo-β-lactamase

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 Bush-Jacoby β-laktamaz Sınıflandırmasının Ambler Moleküler Sınıflandırması ile Karşılaştırılması

Tablo 2 Reaktiflerin strip kuyucuklarına dağıtımı

Tablo 3 qPCR programı

Tablo 4 Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında rCDM ve mCIM ile karbapenemaz tespiti

Tablo 5 Karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında rCDM ve mCIM ile karbapenemaz tespiti

Tablo 6 Karbapenem dirençli ve duyarlı izolatların rCDM ve mCIM test sonuçları

Tablo 7 142 *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatının mCIM ve rCDM istatistik sonuçları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Toplama tüpü (collection tube) ve içerisinde yer alan mini tüp

Şekil 2 DNA ekstraksiyon prosedürü

Şekil 3 qPCR cihazına yerleştirilen 8'li stripler

Şekil 4 Threshold döngü sayısı (Cq) <38 saptanan, pozitif olarak değerlendirilen sigmoidal eğriler

Şekil 5 Bakteri kolonisi ile kaplı imipenem diski

Şekil 6 İmipenem disklerinin agara yerleştirilmesi

Şekil 7 *K. pneumoniae* için rCDM sonuçlarını değerlendirme (6.saat)

Şekil 8 *K. pneumoniae* için mCIM sonuçlarını değerlendirme (20.saat)

Şekil 9 Karbapenem dirençli izolatların dağılımı

Şekil 10 Karbapenem duyarlı izolatların dağılımı

Şekil 11 Karbapenem direnç genlerinin dağılımı

ÖZET

AMAÇ

Çoklu ilaç dirençli bakterilerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun bir sonucu olarak karbapenemlere karşı direnç gelişimi giderek artan oranda bildirilmektedir. Direncin önemli bir sebebi olan karbapenemaz üretimini moleküler yöntemlerle göstermek pahalı ve zaman alıcıdır. Rutin çalışmalarda hızlı ve basit bir yöntemle karbapenemaz üreten suşların tespit edilebilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada yeni geliştirilen hızlı karbapenemaz tespit yönteminin (rCDM), altın standart moleküler yönteme göre duyarlılığının araştırılmasının yanı sıra Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, M100) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) tarafından önerilen diğer bir fenotipik yöntem olan modifiye karbapenem inaktivasyon yöntemi (mCIM) ile uyumunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamıza 12.12.2020-01.08.2021 tarihlerinde SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 50'si kontrol olmak üzere toplam 152 gram negatif (*Klebsiella spp*., *Escherichia coli*) bakteri dahil edilmiştir. Suşların tanımlamaları VITEK®MS (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa); karbapenem duyarlılıkları VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) ile yapılmıştır. Karbapenem dirençli izolatların karbapenem direnç genleri multipleks polimeraz zincir reaksiyonu [Karbapenem ve Kolistin Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye)] ile moleküler olarak saptanmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlara fenotipik olarak karbapenemaz saptanması için kullanılan rCDM ve mCIM testleri uygulanmıştır.

Moleküler yöntem altın standart kabul edilerek rCDM testinin duyarlılığı hesaplanmıştır. Her iki fenotipik test (rCDM ve mCIM) arasındaki farkı incelemek için McNemar testi; uyumluluk derecelerini belirlemek için ise Cohen kappa analizi uygulanmıştır.

BULGULAR

Karbapenem dirençli 102 izolatın 92'sinde qPCR kiti panelinde yer alan direnç genlerinden (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA23/58}$, *bla*$_{OXA-48}$) en az biri tespit edilmiş olup, en sık *bla*$_{OXA-48}$ (%90,2) mevcuttur. Hızlı karbapenemaz tespit yönteminin duyarlılığı %100 olarak saptanmıştır. İki fenotipik yöntemin sonuçları karşılaştırıldığında aralarında istatiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. ($P_{McNemar}$:1, Kappa katsayısı:1.00)

SONUÇ

Hızlı karbapenemaz tespit yönteminin duyarlılığının yüksek saptanması, özellikle ülkemizde sık görülen karbapenemaz tiplerinin tespitinde iyi bir performans sergilemesi, mCIM ile yüksek derecede uyum göstermesi, kolay uygulanabilir ve hızlı bir yöntem olması nedeniyle rutin laboratuvarlarda kullanımının uygun olduğu kanaatine varılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: *Enterobacteriaceae,* Hızlı karbapenemaz tespit metodu, karbapenem direnci, karbapenemaz

PHENOTYPICAL DETECTION OF CARBAPENEMASE PRODUCTION BY THE RAPID CARBAPENEMASE DETECTION METHOD (rCDM) IN CARBAPENEM RESISTANT ISOLATES (*KLEBSIELLA SPP., ESCHERICHIA COLI*)

ABSTRACT

AIM

Carbapenem group antibiotics are frequently used in the treatment of infections caused by multi-drug resistant bacteria. As a result, the development of resistance to carbapenems has been increasingly reported. Detection of carbapenemase production, which is an important cause of resistance, by molecular methods is expensive and time consuming. In routine studies, it is necessary to detect carbapenemase producing strains with a fast and simple method. In this study, it was aimed to investigate the sensitivity of the newly developed rapid carbapenemase detection method (rCDM) compared to the gold standard molecular method, as well as to evaluate its compatibility with the modified carbapenem inactivation method (mCIM), which is another phenotypic method recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, M100) and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

MATERIALS AND METHODS

A total of 152 gram-negative (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*) bacteria, 50 of which were control, isolated from various clinical samples sent to University of Health Sciences Haydarpaşa Numune Health Practice and Research Center Medical Microbiology Laboratory between 12.12.2020-01.08.2021 were included in our study. Identification of strains were determined with VITEK®MS (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, France); carbapenem sensitivities were determined with VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, France). Carbapenem resistance genes of carbapenem resistant isolates were determined molecularly by Multiplex polimerase chain reaction [Carbapenem and Colistin Resistance qPCR kit (Bioeksen, Turkey)]. The rCDM and

mCIM tests, which are used to detect carbapenemases phenotypically, were applied to all isolates included in the study.

The sensitivity of the rCDM test was calculated by accepting the molecular method as the gold standard. McNemar test was applied to examine the difference between both phenotypic tests (rCDM and mCIM), while Cohen kappa analysis was used to determine the degree of agreement.

RESULTS

At least one of the resistance genes included in the qPCR kit panel (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA23/58}$, *bla*$_{OXA-48}$) was detected in 92 of 102 carbapenem-resistant isolates, with blaOXA-48 (90.2%) being the most frequently observed. The sensitivity of rCDM test was found to be 100%. When the results of the two phenotypic methods were compared, there was no statistically significant difference between them. ($P_{McNemar}$:1, Kappa coefficient:1.00)

CONCLUSION

It has been concluded that rCDM is highly sensitive, has a good performance in detecting the carbapenemase types that are common in our country, has a high degree of compatibility with mCIM, and is an easy-to-apply and fast method, so it is suitable for use in routine laboratories.

KEYWORDS: *Enterobacteriaceae,* Rapid carbapenemase detection method, carbapenem resistance, carbapenemase

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotik direnci, önemli bir halk sağlığı problemi olup yıllar içinde antibiyotiklerin aşırı ve/veya yanlış kullanımı antibiyotik direnç oranlarında artmaya sebep olmuştur. Düzensiz antibiyotik kullanımı, ilaç direncine neden olan virülans faktörlerinin ortaya çıkmasına, hastane içi çapraz enfeksiyonların artmasına ve hatta klinik tedavilerin zorlaşmasına neden olmaktadır (1). Bu küresel tehdit nedeniyle artık hastanelerde antibiyotik kullanımı ile ilgili politikalar geliştirilmeli ve mümkün olan en iyi tedavi her hasta için ayrı ayrı oluşturulmalıdır. Böylece direnç gelişimi en aza indirilirken maliyetlerde de azalma sağlanacaktır (2).

Özellikle gram negatif basillerin antimikrobiyal direnci günümüzde önemli bir sorundur (1). Sefalosporinaz ve geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerine sahip gram negatif mikroorganizmaların tedavisinde önemli bir seçenek olan karbapenem grubu antibiyotiklere direnç gelişimi endişe verici bir sağlık hizmeti problemidir (3). Ülkemizde ve hatta dünya çapında karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae'*ların varlığı bu mikroorganizmalarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde sorun yaratmaktadır (4).

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların çoklu ilaç dirençli (ÇİD) başlıca patojenleri olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* ürettikleri GSBL ve/veya karbapenemazlar ile antimikrobiyal tedavide yetersizliğe neden olmaktadır (5).

Karbapenemlere direnç gelişiminde farklı mekanizmalar rol oynamakla birlikte karbapenemaz enzim varlığı daha sık gözlenmesinin yanı sıra bakteriler arasında hızlı yayılma potansiyeli nedeniyle öne çıkmaktadır. Dolayısıyla bu enzimlerin varlığının erken tespit edilmesi hem tedavinin doğru planlanabilmesi hem de dirençli bakterilerin yayılımının önlenebilmesi için önemlidir (4).

Karbapenemaz üretiminin doğrulanması için kullanılan moleküler yöntemler pahalı ve emek yoğun işlemler olduğu için rutin çalışmalarda karbapenemaz üreten suşların hızlı ve basit bir yöntemle saptanması zorunlu hale gelmiştir.

Karbapenemazların fenotipik olarak saptanması amacıyla geliştirilen birçok farklı yöntem (modifiye hodge testi, karbapenem inaktivasyon metodu vb.) mevcuttur. Bu yöntemlerin duyarlılıkları taşıdıkları karbapenem direnç genlerine göre değişmektedir.

Karbapenemlere dirençli olarak saptanmış karbapenemaz pozitif olduğu düşünülen izolatların karbapenemaz üretiminin fenotipik tespiti için Jing ve ark. (2019) tarafından optimizasyonu yapılan hızlı karbapenemaz tespit yöntemi (rCDM) bu amaçla geliştirilen yöntemlerden biridir. Bu çalışmada karbapenem dirençli izolatlarda multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) ile karbapenem direnç genleri moleküler olarak saptanmış, karbapenemaz üretimini göstermek için fenotipik yöntemler olan rCDM ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, M100) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) tarafından önerilen modifiye karbapenem inaktivasyon yöntemi (mCIM) uygulanmıştır. Yeni bir yöntem olan rCDM testinin duyarlılığı, mCIM testi ile uyumu ve rutinde kullanılıp kullanılamayacağı incelenmiştir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.*ENTEROBACTERALES*

Enterobacteriales (sinonim: *Enterobacterales*) çeşitli gram negatif çomak şeklinde, fakültatif anaerop bakteri türlerinden oluşan geniş bir gruptur ve *Gammaproteobacteria* sınıfında yer alır. Yapılan genomik analizler sonucunda *Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae* ve *Budviciaceae* olmak üzere yedi ayrı aileye ayrılmıştır. *Enterobacteriaceae* ailesi *Enterobacteriales* içinde yer alan 250'den fazla türü içermesiyle taksonomik açıdan en çeşitli ailelerden biridir (6).

Enterobacteriaceae doğada her yerde bulunabilir. Bazı türler karasal ortamlarda veya su ortamlarında serbest olarak varlıklarını sürdürürken bazı türler sadece hayvanlar, bitkiler veya böceklerle ilişkilidir. Birçoğu insan, hayvan ve/veya bitkiler için enfeksiyonlara neden olabilen önemli patojenlerdir (7).

Enterobacteriaceae ailesi içerisinde yer alan *Klebsiellae* soyu insanlarda çeşitli fırsatçı enfeksiyonlardan sorumlu olan dört büyük cinsten (*Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Serratia)* oluşurken *Escherichieae* soyunda iki cins (*Escherichia* ve *Shigella*) yer almaktadır (8).

2.2.*KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

2.2.1.Genel Bilgiler

Klebsiella pneumoniae ilk olarak 1875 yılında Edwin Klebs tarafından *Enterobacteriaceae* familyasına ait gram negatif bir basil olarak tanımlanan, hareketsiz, katalaz pozitif, oksidaz negatif, kapsüllü, fakültatif anaerop özellik gösteren bir mikroorganizmadır (9,10). 1882 yılında ise Carl Friedlander tarafından pnömoniden ölen bir hastanın akciğerlerinden izole edilmiş olup 1886 yılına kadar Friedlander'ın basili olarak adlandırılmıştır (11). İnsan normal mikrobiyatasında, özellikle gaita florasında yer alan *K. pneumoniae* fırsatçı patojen olarak hastane enfeksiyonlarına neden olabilmektedir (12,13).

Klebsiella cinsi *Klebsiellae* soyunda yer alır ve insanlarda önemli fırsatçı enfeksiyonlara neden olabilen türleri içerir. *Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Klebsiella granulomatis, Klebsiella variicola, Klebsiella singaporensis* ve *Klebsiella alba* olmak üzere 6 tür bu cins içerisinde yer almaktadır. Atrofik rinite neden olan *Klebsiella ozaenae* ve granülomatöz bir hastalık olan rinoskleromaya neden olan *Klebsiella rhinoscleromatis K. pneumoniae*'nın alt türleri olarak kabul edilirler (8). *Klebsiella pneumoniae* ve *K. oxytoca* insanlarda en sık izole edilen iki türdür (14). *Klebsiella pneumoniae* indol negatif olmasıyla *K. oxytoca'*dan ayırt edilebilir (8).

Su, kanalizasyon, toprak, bitki yüzeyi gibi çevresel alanlar *K. pneumoniae* kolonizasyonu veya enfeksiyonu için muhtemel bir rezervuar görevi görmektedir. Hastane ortamında ise sağlık çalışanları ile hastalar arasında kişiden kişiye temas ve sağlık çalışanlarının elleri başta olmak üzere kontamine yüzeyler ve kullanılan aletler *K. pneumoniae* bulaşında rol oynayan önemli potansiyel kaynaklar olarak kabul edilmektedir (15).

2.2.2.Virülans Faktörleri

Klebsiella pneumoniae oldukça dirençli bir bakteridir ve bu güçlü patojeniteyi sağlamasında savunma modeli olarak iyi bir korunma sistemi geliştirmesinin etkili olduğu düşünülmektedir (16). Kapsül yapısı, lipopolisakkarit, siderofor, üreaz

aktivitesi, fimbrialar, biyofilm formasyonu başlıca virülans faktörleridir (16,17). Dış membran proteini A, peptidoglikan ilişkili lipoprotein ve murein lipoprotein gibi dış membran proteinleri, porinler, efluks pompaları, demir taşıma sistemleri ve allantoin metabolizmasında rol oynayan genler son zamanlarda tanımlanan *K. pneumoniae* virülansında rol oynadığı düşünülen faktörlerdir (16).

Klinik izolatlardan izole edilen *K. pneumoniae* suşları sıklıkla visköz polisakkarit kapsül üretmektedir (17). Genellikle kompleks asidik polisakkarit birimlerden oluşan ve bakteriyi fagositozdan ve serumdaki bakterisidal etkili faktörlerden koruyan bu kapsül *Klebsiella*'nın virülansı için esas yapıdır (18). Klinik enfeksiyonlar sırasında suşların ayrımında kullanılan tekrarlayan kapsüler alt birimlerden oluşan 77'den fazla farklı serolojik tip tespit edilmiştir (17,18).

Lipopolisakkarit tüm gram negatif bakterilerde bulunan endotoksin olarak da bilinen önemli bir dış membran komponentidir. *Klebsiella pneumoniae* kapsülü için 77 farklı K antijeni tespit edilmiş olmasına rağmen dokuz farklı O antijeni tanımlanmıştır ve en sık gözlenen O1 tipidir. Lipopolisakkarit enfeksiyon sırasında *K. pneumoniae*'yı hem humoral savunma sistemine karşı hem de komplemana karşı korumada temel komponenttir (16)

2.2.3.*Klebsiella pneumoniae'*nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Klebsiella pneumoniae, çeşitli invaziv enfeksiyonlarda *E. coli'*den sonra ikinci sıklıkta görülen gram negatif mikroorganizmadır (19). Sıklıkla üriner sistem enfeksiyonu, solunum yolu enfeksiyonu, intraabdominal enfeksiyon, dolaşım yolu enfeksiyonu, menenjit, yara-cerrahi alan enfeksiyonu gibi nozokomiyal fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır (19,20).

Hasta popülasyonuna bağlı olarak, klasik *K. pneumoniae* suşları, idrar yolu enfeksiyonunun ikinci veya üçüncü en sık nedenidir (16). Primer pnömoninin klasik formuna neden olabildiği gibi yoğun bakım ünitelerinde de ventilatörle ilişkili pnömonilerin önde gelen etkenleri arasında yer almaktadır (8,21). *Escherichia coli*'den sonra gram negatif bakteri kaynaklı bakteriyemilerin ise en sık ikinci nedenidir (22). Toplumdan edinilmiş *K. pneumoniae* bakteriyemisi daha çok altta yatan diabetes mellitus varlığı ile ilişkiliyken, nozokomiyal bakteriyemide neoplastik hastalık varlığı göze çarpmaktadır (23). *Klebsiella pneumoniae'nın* neden olduğu

menenjit tablosu toplum kaynaklı olarak nadir görülürken nöroşirürji ameliyatları sonrası nozokomiyal enfeksiyon olarak daha çok karşımıza çıkmaktadır (24).

2.2.4.Laboratuvar Tanısı

Klebsiella pneumoniae enfeksiyonunun tanısı, kan, balgam, idrar, aspire edilmiş vücut sıvısı, plevral efüzyon, perikardiyal efüzyon, sinoviyal sıvı, beyin omurilik sıvısı ve apse gibi çeşitli klinik materyallerden hazırlanan kültür örneklerinin incelenmesi ile yapılmaktadır (25).

Klebsiella cinsinin üyeleri gram negatif, hareketsiz, fakültatif anaerobik basillerdir. Genişlikleri 0,3 ila 1,0 μm, uzunlukları ise 0,6 ila 6,0 μm arasında değişmektedir (26). Gram boyamada tipik olarak kısa, dolgun, gram negatif basiller olarak görünürler ve genellikle açık bir alan olarak görünen kapsülle çevrelenirler (25).

Besiyerlerinde mukoid, büyük koloniler görüldüğü zaman *Klebsiella* türleri akla gelmelidir (8). Kanlı agarda 3-4 mm çapında mukoid formda koloni morfolojisi sergilerler (27). Seçici besiyeri olan MacConkey agarda laktoz fermentasyonu ve asit üretimi nedeniyle pembe-mor renkli büyük, mukoid koloniler şeklinde görülürler (8). Hektoen enterik agar ve ksiloz lizin deoksikolat agarda ise sarı renkte koloniler oluştururlar (27).

Klebsiella pneumoniae'nın homolog DNA'lara sahip üç alt türü *K. pneumoniae subsp. pneumoniae, K. pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* farklı biyokimyasal reaksiyonlara sahip olmalarıyla ayırt edilebilmektedirler (28). İndol üretimi, ornitin dekarboksilaz üretimi, Voges-Proskauer reaksiyonu, malonat kullanımı, metil kırmızısı reaksiyonu ve o-nitrofenil-β-D-galaktopiranosid üretimi *Klebsiella* türlerini ayrım için kullanılabilen başlıca biyokimyasal reaksiyonlardır (8,26).

Klebsiella pneumoniae, laktozu fermente edebilen, H_2S, indol ve metil kırmızısı negatif, Voges-Proskauer reaksiyonu pozitif ve sitratı tek karbon kaynağı olarak kullanan bir bakteridir. Diğer 2 alt tür *K. pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis'*te ise indol ve Voges-Proskauer reaksiyonu negatifken metil kırmızısı reaksiyonu pozitiftir (8,28). *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* malonat negatif iken diğer 2 alt tür malonat pozitiftir (8). *Klebsiella* cinsinin

diğer türlerinden biri olan *K. oxytoca* ise Voges-Proskauer reaksiyonu ve indol pozitiftir ayrıca diğerlerinden farklı olarak 10ºC'de üreyebilmektedir (28).

2.2.5.Antibiyotik Tedavisi ve Direnç Profili

Bakteriyel enfeksiyonların tedavi edilebilmesi büyük ölçüde etkin uygulanan bir antimikrobiyal tedavi ile sağlanmaktadır (29). Etkili antibiyotiklerin geç kullanılması mortalite ve morbidite oranlarının artmasına neden olurken aşırı ve uygun olmayan antibiyotik kullanımı ise ÇİD patojenlerde artışa sebep olmaktadır (30).

Klebsiella pneumoniae, antimikrobiyal direncin yayılmasında rol oynayan en önemli fırsatçı patojenlerden biridir (31). Mevcut antimikrobiyal direnci klinik uygulamalarda gözlemlenmiş ve GSBL üreten *K. pneumoniae* tarafından meydana gelen pek çok nozokomiyal enfeksiyon salgını yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca sepsis vakalarında yapılan gözlemlerde *K. pneumoniae* suşlarının aktarılabilen çoklu ilaç direnci sergiledikleri saptanmıştır (1).

Ampisiline karşı doğal dirençli olan *K. pneumoniae*'nın neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde öncelikle sefalosporin ve aminoglikozid grubu antibiyotikler tercih edilmekle birlikte florokinolon grubu antibiyotikler de kullanılabilmektedir (2,14,32).

Aminoglikozid grubu antibiyotikler protein sentezini inhibe eden, güçlü geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (33). *Klebsiella pneumoniae*'nin aminoglikozidlere kromozomal tolerans mekanizmasının temelinde efluks pompa sisteminde değişiklik, porin kaybı gibi mekanizmalarla oluşan hücre membran geçirgenliğindeki modifikasyonlar ve aminoglikozid modifiye edici enzim genleri yer almaktadır (32).

Florokinolonlar DNA giraz enzimini inhibe ederek hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etkili olan geniş spektrumlu antibakteriyel ilaçlardır (34). *Klebsiella pneumoniae*'da hedef gen mutasyonu, MDR efluks pompa üretimi, hedef koruma proteinleri ve enzimlerin modifikasyonu florokinolon direnci gelişmesindeki temel mekanizmalardır (32).

Klebsiella pneumoniae izolatlarının GSBL enzimi üretmeleri sefalosporinlere karşı dirençli olmalarına sebep olmaktadır. Dolayısıyla bu antibiyotiklerin *K. pneumoniae* ile ilişkili enfeksiyonlarda kullanımı zorlaşmaktadır (14). İlk olarak 1960'lı yıllarda *K. pneumoniae* 'daki penisilin direncinin saptanması ile birlikte birinci

sınıf β-laktamaz genleri (*bla*$_{SHV-1}$ *ve bla*$_{TEM-1}$) keşfedilmiştir. Bundan yirmi yıl sonra, Almanya'daki yoğun bakım ünitesindeki hastalardan ilk GSBL genine (*bla*$_{SHV-2}$) sahip *K. pneumoniae* izolatları tespit edilmiştir. Ardından Fransa'da plazmid geçişli GSBL varyantı, *bla*$_{TEM-3}$ geni içeren *K. pneumoniae* suşu saptanmıştır. 1990-2000'lere gelindiğinde *K. pneumoniae* GSBL kaynaklı nozokomiyal enfeksiyon salgınlarından sorumlu ana patojen haline gelmiştir (32).

Geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten *K. pneumoniae* suşlarına karşı tedavide karbapenem grubu antibiyotikler ön planda yer almaktadır (13). Ancak dirençli etkenlerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin yaygın olarak kullanılması bu grup antibiyotiklere de direnç gelişimi ile sonuçlanmıştır. Karbapenemlere karşı gelişen direnç mekanizmalarında önemli bir yere sahip olan karbapenemaz üretimi ilk olarak 1990'lı yıllarda ortaya çıkmıştır. Ardından tüm dünyada önemli bir risk faktörü haline gelecek şekilde hızla yayılmıştır (3).

Karbapenem grubu antibiyotiklere direnç geliştirmiş olan *K. pneumoniae* suşları ile meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde alternatif olarak kolistin (Polimiksin E) kullanılmaya başlanmış ve özellikle tigesiklin ile birlikte kombine tedavi uygulaması giderek yaygınlaşmıştır. Ancak bu durum kolistin direncinde artışa sebep olmuştur (35). Lipopolisakkarit modifikasyon sistemi, kapsüler polisakkarit yapısı, efluks pompa aşırı üretimi veya plazmid kaynaklı direnç aktarımı kolistin direncine neden olan başlıca mekanizmalardır (32).

2.3.*ESCHERICHIA COLI*

2.3.1.Genel Bilgiler

Escherichia coli gastrointestinal sistemde ve vücudun diğer kısımlarında patojenik olabilen normal kolon florasının bir elemanıdır (36). İlk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından tanımlanmıştır (37).

Enterobacteriaceae ailesinde *Escherichia* cinsi içerisinde *Escherichia albertii, Escherichia fergusonii, Escherichia hermannii, Escherichia vulneris* ve *E. coli* olmak üzere beş tür bulunmaktadır (8). Bunların içerisinde yer alan en önemli ve en sık görülen gram negatif basil *E. coli*'dir (38).

Lipopolisakkarid yapının polisakkarit kısmında bulunan O somatik antijen, flajeller antijen H ve polisakkarid kapsül ile ilişkili olan K antijeni *E. coli'*nin serotiplendirilmesinde kullanılmaktadır (36).

2.3.2.Virülans Faktörleri

Escherichia coli Enterobacteriaceae ailesine ait genel virülans faktörlerine ek olarak kendine has adezinler ve ekzotoksinlere de sahiptir (38). Başlıca virülans faktörleri; konak yanıtını aktive eden ve inflamatuar yanıtın artmasına neden olan nitrik oksit ve çeşitli sitokinlerin (IL-1, TNF-α) üretimini arttıran hücre duvar bileşeni olan lipopolisakkarit yapısı, polisakkarit yapıdaki kapsül, antijenik faz varyasyonu, Tip III sekresyon sistemi, flajella ve enterobaktin, aerobaktin gibi demir bağlayan bileşikler olan sideroforlardır (38,39).

Fimbria ve fimbriaların kısa şekli olan pili gibi adeziv moleküllerin varlığı da *E. coli'*nin patojenitesinde önemli bir yere sahiptir (39,40). Mukozal tutunmaya ve sitokin üretimine neden olan P fimbria insanlarda hem alt üriner sistem enfeksiyonlarında hem de piyelonefrit patogenezinde önemli bir yere sahiptir. S fimbria ise konakçı dokularda yayılımı kolaylaştırır ve idrar yolu enfeksiyonu dışında sepsis ve menenjit ile ilişkili *E. coli* suşlarında da bulunabilmektedir (40).

Enterotoksijenik *Escherichia coli* (ETEC) tarafından üretilen kolonizasyon faktörü adezinleri (CFA/I, CFA/II, CFA/III) konakçı membran glikoprotein reseptörlerini tanıyan ve böylece konakçı spesifitesini sağlayan ve hastalık oluşumu için gerekli olan önemli diğer fimbrial virülans faktörlerindendir (38,41).

Enteropatojenik *Escherichia coli'*nin (EPEC) yapmış olduğu sulu diyarede mikroorganizmanın bağırsak epiteline tutunmasında ve epitel üzerinde mikrokoloni oluşturabilmesinde bundle-forming pili olarak adlandırılan adezin molekülü görev almaktadır (36,38). Bundle-forming pilusu enterohemorajik *Escherichia coli'*nin (EHEC) hastalık patogenezinde de önemli bir yere sahiptir (36).

Enteroagregatif *Escherichia coli'*nin (EAEC) neden olduğu gastroenterit patogenezinde bundle-forming pili benzeri adezinler olan aggregatif adherence fimbrialar (AAF/I, AAF/II, AAF/III) yer almaktadır (38).

Enteroinvaziv *Escherichia coli'*nin (EIEC) kolon epiteline tutunmasından sorumlu olan adezin ise invaziv plazmid antijen molekülüdür (38).

Toksinler de *E. coli* ile ilişkili çeşitli hastalıklarda önemli virülans faktörlerindendir. Bu toksinlerden biri olan α-hemolizin üropatojenik *E. coli'*nin ürettiği ve üst üriner sistem enfeksiyonlarıyla ilişkili bir lipoproteindir (40).

Cytotoxic necrotising factor 1 piyelonefrit vakalarının üçte birinde *E. coli*'nin ürettiği bir toksindir (40). Bu toksinin in vivo etkisine bakıldığında mesane epitelinde dökülmeye yol açtığı ve böylece bakterinin dokuya geçebildiği gözlenmiştir (39).

Secreted autotransporter toxin piyelonefrite neden olan *E. coli* suşlarında görülebilen bir diğer sitokindir. Mesane ve böbrek kaynaklı hücre dizilerine karşı toksik etki göstermektedir (40).

İntestinal hastalığa neden olan pek çok *E. coli* suşunda da toksin üretimi gözlenmektedir (38). Örneğin ETEC ısıya duyarlı ve ısıya dirençli olmak üzere iki toksin üretmektedir (42). Genleri plazmid tarafından kodlanan ısıya duyarlı toksin siklik adenozin monofosfat; ısıya dirençli toksin ise siklik guanozin monofosfat düzeyinde artışa neden olarak etki göstermektedir. Enteroagregatif *Escherichia coli'*nin ürettiği enteroagregatif heat stable toksin ve plazmid ile kodlanan toksin bu mikroorganizmaya bağlı gelişen gastroenterit patogenezinde önemli rol oynamaktadır (38). Verositotoksin veya shiga-like toksin 1 ve 2 olarak adlandırılan toksin ise EHEC tarafından üretilen bir diğer önemli toksin yapısıdır (42).

2.3.3.*Escherichia coli*'nin Neden Olduğu Klinik Tablolar

Escherichia coli'nin neden olduğu enfeksiyonları intestinal ve ekstraintestinal hastalıklar olarak sınıflandırmak mümkündür (36).

2.3.3.1.İntestinal hastalıklar: İntestinal hastalıkların bulaş yolu genellikle kontamine gıda ve suların fekal oral yolla alınmasıyla gerçekleşmektedir (36). *Escherichia coli*'ye bağlı EAEC, EPEC, EHEC, EIEC, ETEC ve diffüz adheran *Escherichia coli* (DAEC) olmak üzere altı farklı intestinal enfeksiyon etkeni tanımlanmıştır (42).

2.3.3.2.Ekstraintestinal hastalıklar: *Escherichia coli* kaynaklı ekstraintestinal hastalıklar genellikle kişinin kendi florasından kaynaklanmaktadır (36). Üriner sistem enfeksiyonu, neonatal menenjit, septisemi başlıca sebep olduğu

klinik tablolardır (38). Bunların dışında nozokomiyal enfeksiyonlara, abdominal enfeksiyonlara, pnömoniye, yara-yumuşak doku enfeksiyonlarına ve osteomyelite de neden olabilmektedir (42).

Üropatojenik *E. coli* üriner sistem enfeksiyonunun en sık görülen etkenidir. İdrar yolu enfeksiyonlarında en sık saptanan üropatojenik *E. coli* serotipleri O1, O2, O4, O6, O7 ve O75'tir. Üretrayı kolonize etmesi sonrasında mesane tutulumuyla sistite ve sonrasında asendan yol ile üst üriner sisteme ulaşarak ya da hematojen yayılım ile piyelonefrite sebep olabilmektedir (42). Özellikle kadınlarda enfeksiyon riski daha yüksektir (36).

Escherichia coli yaşamın ilk bir ayında menenjite sebep olan major etkenler arasında yer almaktadır (36). Yenidoğan menenjitine neden olan *E. coli* suşlarının yaklaşık %80'ni *N. meningitidis*'in B grubu kapsüler polisakkariti ile çapraz reaksiyona giren K1 kapsüler antijenine sahiptir (41,43).

Escherichia coli gibi gram negatif basiller ile meydana gelen septisemilerin çoğunun kaynağı idrar yolları veya gastrointestinal sistemdir (38). Konak savunmasının yetersiz kaldığı durumda *E. coli* kan dolaşımına katılarak sepsise neden olabilmektedir (41).

2.3.4.Laboratuvar Tanısı

Escherichia coli enfeksiyonunun tanısı enfeksiyon bölgesinden alınan çeşitli örneklerin kültür incelemesi sonrası yapılabilmektedir (42). *Escherichia coli'*nin normalde steril olan vücut alanlarından izole edilmesi tanısal açıdan anlam taşımaktadır (36).

Mikroskobik değerlendirmede *E. coli,* direk örnekten hazırlanan Gram boyamada 1-3 μm uzunlukta 0.4-0.7 μm kalınlıkta gram negatif basiller şeklinde görülmektedir. Besiyerine yapılan ekimlerin 37°C'de 18-24 saat inkübasyondan sonra değerlendirmesinde ise kanlı agarda sirküler tarzda, gri renkte ıslak koloniler oluşturmaktadır. Kanlı agarda hemoliz oluşturması değişkenlik sergilemektedir. MacConkey agarda ise düz, laktoz fermentasyonuna bağlı olarak pembe renkli koloniler meydana getirmektedir (42). Sorbitollü MacConkey agar ise EHEC'i ayırt edebilmek için kullanılabilmektedir (36).

Escherichia coli'nin biyokimyasal özelliklerine bakıldığında katalaz, indol, metil kırmızısı reaksiyonları pozitif olarak izlenirken; oksidaz, sitrat, üreaz, fenilalanin deaminaz testleri ve hidrojen sülfür üretimi ise negatiftir (8,42). Triple sugar iron agarda gaz üretiminin eşlik ettiği asit/asit reaksiyon meydana getirmektedir (42).

2.3.5.Antibiyotik Tedavisi ve Direnç Profili

İnsan bağırsağında kommensal olarak bulunan fakültatif *E. coli* suşları yanı sıra intestinal ve ekstraintestinal olmak üzere çeşitli klinik tablolarla kendini gösteren patojenik *E. coli* izolatları da bulunmaktadır. Aminoglikozidler, florokinolonlar, ikinci-üçüncü-dördüncü kuşak sefalosporinler, trimetoprim-sülfometoksazol gram negatif bakterilerle meydana gelen enfeksiyonlarda başlıca kullanılan antimikrobiyal ajanlardır (44).

Escherichia coli'nin neden olduğu intestinal hastalıklar genellikle kendini sınırlayıcı özellikte olduğundan destekleyici tedavi yeterli olmakla birlikte ağır durumlarda ya da EIEC ile meydana gelen dizanteriform ishallerde florokinolonlar veya uygun sefalosporinler kullanılabilmektedir. Ancak hemolitik üremik sendrom gelişimine sebep olabileceği için EHEC ile meydan gelen enfeksiyonlarda antimikrobiyal ajanlar kullanılmamalıdır (44).

Escherichia coli kaynaklı en sık gözlenen ekstraintestinal klinik tablolardan olan komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarında nitrofurantoin, trimetoprim-sülfometoksazol, fosfomisin ve florokinolonlar başlıca kullanılabilen antimikrobiyal ajanlardır. Direnç geliştirme potansiyeli daha düşük olan (nitrofurantoin, fosfomisin) antibiyotikler öncelikli tercih edilmelidir. Trimetoprim-sülfametoksazol önemli birinci basamak antibiyotik iken florokinolonlar ve geniş spektrumlu antibiyotikler ikinci basamak ajanlar olarak ayrılmalıdır (45). Çünkü antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı, sağlık bakım ortamlarında enfeksiyonların kontrolünün etkin yapılamaması antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve yayılmasına neden olabilmektedir (46).

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 nedeniyle direnç mekanizmalarının iyi anlaşılması ve yayılımlarının önlenmesi önem arz etmektedir (47).

Escherichia coli üretmiş olduğu farklı β-laktamaz grubu enzimler sayesinde (GSBL, AmpC, karbapenemaz) sergilediği hidrolitik aktiviteyle bazı β-laktam ajanlara karşı dirençli hale gelebilmektedir. Son 20 yıla bakıldığında β-laktamlar, kinolonlar, aminoglikozitler, sülfonamidler ve fosfomisin gibi antibiyotik gruplarına dirençli *E. coli* suşlarında artış saptanmakla birlikte bu direncin polimiksinler ve karbapenemlere karşı da görülmeye başlaması endişe yaratmaktadır (47).

Enterobacteriaceae'da yer alan herhangi bir aile üyesinde GSBL üretimi saptanabilmekle birlikte *Klebsiella spp*. ve *E coli*, GSBL üretiminde önde gelen iki mikroorganizmadır (47). AmpC tipi β-laktamaz ise genellikle *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde gözlenmekle birlikte 7-α metoksisefalosporinlerin (sefoksitin ve sefotetan) kullanımına devam edilmesi, β-laktamaz inhibitörlerinin kullanımının artması gibi sebeplerle AmpC genlerinin plazmidler aracılığıyla farklı bakteriler arasında yayıldığı ve böylece *E. coli, Klebsiella spp*. ve *Shigella spp.* gibi normalde bu geni taşımayan veya düşük düzeyde ifade eden türlerde de AmpC tipi β-laktamaz saptanmaya başladığı gözlenmiştir (48). Geniş spektrumlu beta-laktamaz ve AmpC üreten *E. coli*'nin sebep olduğu ciddi enfeksiyonların giderek artması sonucu son tedavi seçeneği olarak karbapenemler kullanılmaya başlamıştır. Ancak bu durum karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve daha az oranda *E. coli* izolatlarının ortaya çıkmasıyla sonuçlanmıştır. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), metallo-β-laktamazlar (VIM, IMP, GIM ve NDM tipleri dahil) karbapenem hidrolize edici oksasilinazlar (OXA) *E. coli*'de tespit edilen başlıca karbapenemaz tipleridir (47). New Delhi metallo-β-laktamaz (NDM) ve karbapenem hidrolize edici OXA-48 yapılan çalışmalarda *E. coli*'de iki baskın tip olarak saptanmıştır (49,50).

2.4.BETA LAKTAMAZLAR

Beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direncin başlıca nedeni olan β-laktamazlar, dört atomlu β-laktam halka yapısındaki amid bağını parçalayarak antibiyotikleri etkisiz hale getiren bir enzim ailesidir (8). Gram negatif bakterilerde genellikle kromozomal ya da plazmidik kodlama ile sentezlenmektedir (51).

Alexander Fleming tarafından 1928 yılında penisilinin keşfinden sonra 1940 yılında Abraham ve Chain penisilinin etkisini yok eden ve penisilinaz olarak

adlandırdıkları bir enzim yapısını *E. coli'*den elde ettikleri ekstrede saptamışlardır (52). Penisilinin tedavide yaygın kullanılmaya başlamasıyla *Staphylococcus aureus*'ta da plazmid kökenli penisilinaz saptanmış olup sonrasında hızla hem tüm stafilokoklar arasında hem de direnç genlerinin alışverişi yoluyla farklı bakteri türleri arasında bu enzim yayılmıştır (51).

Bir β-laktamazın antibiyotiği hidrolize ve inaktive etmekteki etkinliğini belirleyen, enzimin antibiyotik bileşiği için olan özgüllüğüdür. Bu özgüllük enzimin yapısal olarak stratejik bir bölgesinde bir ya da daha fazla aminoasitte meydana gelen nokta mutasyonlarla değişebilmektedir. Dolayısıyla bu durum yeni geliştirilen ilaçlara karşı hızla direnç gelişimine neden olabilmektedir (8).

Beta-laktamaz enzim ailesini gruplandırmak için çeşitli şemalar geliştirilmiştir. İlk sınıflandırma şemalarından biri Richmond ve Sykes tarafından geliştirilmiş olup zamanla tespit edilen enzim sayı ve çeşitliliği artınca mevcut tablo yetersiz kalmaya başlamıştır (8). Daha sonra Ambler tarafından enzimlerin A, B, C ve D sınıfı β-laktamazlar olmak üzere dört sınıfa ayrıldığı, amino asit dizilimlerine dayanan daha modern bir sınıflandırma geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre A, C ve D sınıfı serin β-laktamazlar; B sınıfı ise metallo-β-laktamazlar (MBL) olarak adlandırılmaktadır (52).

İşlevsel ve moleküler özelliklerin birlikte değerlendirildiği bir başka şema Bush-Jacoby-Medeiros tarafından oluşturulmuştur (8,52). Mevcut β-laktamazların işlevsel olarak 3 gruba ve bunlara ait alt gruplara ayrıldığı, Bush-Jacoby tarafından güncellenen işlevsel ve moleküler sınıflandırmanın Ambler sınıflandırmasıyla karşılaştırılması tablo 1'de gösterilmektedir (8).

Tablo 1: Bush-Jacoby β-laktamaz Sınıflandırmasının Ambler Moleküler Sınıflandırması ile Karşılaştırılması

Bush-Jacoby (2010)	**Ambler Moleküler Sınıf**	**Enzimler**	**Aktif bölge**	**Bulunduğu Bakteriler**
Grup 1 Sefalosporinaz	C	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Serin	*Enterobacteriaceae Acinetobacter spp*
Grup 1e Sefalosporinaz	C	GC1, CMY-37	Serin	*Enterobacteriaceae*
Grup 2a Penisilinazlar	A	PC1	Serin	*S.aureus*
Grup 2b Penisilinazlar	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Serin	*Enterobacteriaceae*
Grup 2be GSBL'ler	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M'ler, PER-1, VEB-1	Serin	*E.coli,K.pneumoniae, K.oxytoca, P.mirabilis, Salmonella* spp., *Kluyvera* spp.
Grup 2ber GSBL'ler	A	TEM-50	Serin	*Enterobacteriaceae*
Grup 2d	D	OXA-01, OXA-10	Serin	*Enterobacteriaceae*
Grup 2de GSBL'ler	D	OXA-11, OXA-15	Serin	*Pseudomonas aeruginosa*
Grup 2df Karbapenemaz	D	OXA-23, OXA-48	Serin	*Acinetobacter baumannii Enterobacteriaceae*
Grup 2e GSBL	A	CepA	Serin	*Proteae*
Grup 2f Karbapenemazlar	A	KPC-2, SME-1, IMI-1	Serin	*Enterobacteriaceae*
Grup 3 Metallo Karbapenemazlar	B	IMP-1, VIM-2, IND-1, L1	Çinko	*Acinetobacter baumannii Pseudomonas aeruginosa*
Grup 4	Dahil değil	Bilinmiyor		

2.4.1.Grup 1 Sefalosporinazlar

Grup 1 sefalosporinaz sınıfına ait enzimler Ambler sınıf C içinde yer almaktadır. Genellikle *Enterobacteriaceae* ailesi içinde yer alan gram negatif

bakterilerin kromozomlarında yer alan yapısal ya da indüklenebilir enzimlerdir. Fenil boronik asit (PBA), dipikolinik asit ve kloksasilin önemli enzim inhibitörleridir (8).

Klinik izolatlarda en sık rastlanılanı CMY olmak üzere FOX, MIR, ACT ve DHA plazmid aracılı grup 1 enzimlere örnektir (8). AmpC β-laktamazlar ise çoğu bakteride indüklenebilen veya mutasyonla aşırı miktarda üretilebilen, sefalotin, sefazolin, sefoksitin, çoğu penisilin ve beta-laktamaz inhibitörlü beta-laktam antibiyotik kombinasyonlarına karşı dirence neden olan kromozomal kaynaklı enzimlerdir. Kromozomal olarak AmpC'ye sahip olmayan veya az miktarda eksprese eden bakterilerde enzim varlığı, AmpC genlerini içeren aktarılabilen plazmidler aracılığıyla görünür hale gelebilmektedir (53).

Alt grup 1e enzimleri mutasyonlar sonucunda aminoasitlerde meydana gelen değişiklikler sonucunda oluşan, seftazidim ve diğer oksiimino-β-laktamlara artmış etkinliğe sahip grup 1 enzimlerinin varyantlarıdır. Bu enzimlerin aşırı miktarda üretilmesine eşlik eden porin kaybı olması durumunda karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli suşlar gözlenebilmektedir (8).

2.4.2.Grup 2 Serin β-Laktamazlar

Ambler sınıf A ve D gruplarını içeren ve aktif bölgelerinde serin bulunan en geniş β-laktamaz grubudur. Alt grup olarak penisilinazları, GSBL'leri ve karbapenemazları içermektedir (8).

2.4.2.1.Penisilinazlar: Alt grup 2a ve alt grup 2b'de yer alan penisilinazlar Ambler sınıf A'da yer alan enzimlerden oluşmaktadır. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe olan alt grup 2a'daki penisilinazlar stafilokoklar ve enterokoklar gibi gram pozitif koklardaki başlıca β-laktamazlar olup benzilpenisilin ve penisilin türevleri için sınırlı etkinliğe sahiptir (8).

Alt grup 2b β-laktamazlar plazmid kaynaklı TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden oluşmaktadır (8). TEM-1 gram negatif bakterilerde en sık rastlanan enzimdir. *E. coli'*deki ampisilin direncinden sıklıkla TEM-1 sorumludur (51). Ayrıca SHV-1 *K. pneumoniae* ve TEM-1 pek çok *Neisseria gonorrheae* ve *Haemophilus influenzae* suşunda bulunabilmektedir (54). Mutasyon nedeniyle TEM-1'de 39. pozisyondaki glutamin yerine lizinin geçmesi sonucu TEM-2 oluşmuştur ancak

izoelektrik noktası artarken substrat profili aynı kalmıştır yani etki spektrumları benzerdir (51,52).

Grup 2b β-laktamazlar dar spektrumlu genellikle transpozonlar tarafından kodlanan enzimler olup penisilinleri ve sefaloridin, sefalotin gibi birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilirler (8,52). Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam tarafından ise inhibe edilmektedirler (54).

2.4.2.2.Geniş spektrumlu beta laktamazlar: Plazmid aracılığıyla yayılabilmeleri ve böylece salgınlara yol açarak tedavide başarısızlığa neden olmaları sebebiyle GSBL enzimleri hastanelerde görülen önemli direnç mekanizmalarından biridir (52). 1980'lerin sonlarında Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) eş zamanlı olarak tanımlanmış ve GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae*' nin neden olduğu enfeksiyonlar sefalosporine dirençli enfeksiyon salgınlarının başlıca sebebi haline gelmiştir (54).

Bu geniş spektrumlu enzimler başta klavulanik asit olmak üzere sulbaktam ve tazobaktam tarafından inhibe olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden türeseler de CTX-M, OXA-1, PER-1, PER-2 gibi, TEM ve SHV kökenli olmayan yeni plazmid kaynaklı GSBL'ler de tespit edilmiştir (8,52).

Alt grup 2be'deki GSBL'ler Ambler sınıf A'da yer almakta olup, başlıca tablo 1'de de belirtildiği üzere TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER-1 ve VEB-1 enzimlerinden oluşmaktadır (8).

TEM-3 enzimi köken aldığı TEM'lerden farklı olarak yeni sefalosporinleri de hidrolize edebilmesi bakımından farklı substrat spektrumuna sahiptir (51).

SHV-2 1983 yılında tespit edilen, ilk SHV türü enzim türevidir. Enzim yapısında meydana gelen mutasyon sonucu 238. pozisyondaki glisin yerine serin aminoasidi gelmesiyle seftazidimi; 240. pozisyondaki glutamin yerine lizin gelmesi sonucu ise sefotaksimi hidroliz etme yeteneği kazanmıştır (52). SHV türevi enzimler genellikle *K. pneumoniae*'da gözlenmekle birlikte *E. coli*, *Citrobacter diversus* ve *P. aeruginosa'*da da bildirilmiştir (51).

CTX-M tipi enzimler ise *Kluyvera*'daki kromozomal β-laktamazlardan kaynaklanan ve bunlarla ilişkili olduğu düşünülen bir başka GSBL türü enzimdir (8). CTX-M tipi beta-laktamaz ilk olarak 1989 yılında Almanya'da *E. coli* suşunda

saptanmış olup 1990'ların başında Batı Avrupa ve Güney Amerika'da yaklaşık aynı zamanlarda ilk CTX-M enzimleri tespit edilmeye başlamıştır (52,54). Zamanla dünya çapında birçok merkezde CTX-M ailesi büyük ölçüde erken dönem TEM ve SHV varyant GSBL'lerin yerini almıştır (54). Bu grup enzimler sefalotini penisilinden ve sefotaksimi ise seftazidimden daha etkili bir şekilde hidrolize etmektedir. Diğer GSBL'lerden farklı olarak tazobaktam ile klavulanik asit veya sulbaktama kıyasla daha iyi inhibe olmaktadır (51).

PER grubu GSBL ilk olarak Fransa'da bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir. PER-1 enzimi klavulanik asit ile inhibe olurken penisilin ve sefalosporinleri hidrolize edebilmektedir (52).

VEB grubu GSBL'lerden VEB-1 enzimi ilk olarak Vietnam'da bir *E. coli* suşunda tespit edilmiştir. Bu enzim klavulanik asit ile inhibe olurken seftazidim, sefotaksim ve aztreonoma karşı yüksek düzeyde direnç sergilemektedir (52).

Bir diğer 2b enzim alt grubu 2ber β-laktamazlar, kompleks mutant TEM yani TEM-50 olarak adlandırılmakta olup TEM ailesi içinde sınıflandırılmaktadır. Etki spektrumları geniş olmakla birlikte klavulanik asit ile olan inhibisyona orta derecede direnç göstermektedir (8).

Alt grup 2d β-laktamazlar başlıca OXA-01, OXA-10 enzimlerini içermekte olup Ambler sınıf D'de yer almaktadır. Kloksasilin veya oksasilini hidrolize etmeleri nedeniyle OXA enzimler olarak isimlendirilirler. Klavulanik asit veya tazobaktam ile olan inhibisyonları ise değişkenlik gösterebilmektedir. Geniş spektrumlu beta-laktamazlar içindeki OXA enzimlerinden olan OXA-11 ve OXA-15 ise OXA-10'da meydana gelen aminoasit değişimi ile türemiş olan ve alt grup 2de'de yer alan enzimlerdir. Grup 2d özelliklerini taşımakta olup seftazidim gibi oksiimino-sefalosporinleri hidrolize edebilme özelliğine sahiptirler ve başlıca *P.aeruginosa* suşlarında saptanmaktadırlar (8).

2.4.2.3.Karbapenemazlar: Karbapenemleri hidrolize etme etkinliğine sahip karbapenemaz enzimlerinin Bush-Jacoby sınıflamasına göre grup 2'de yer alan üyeleri Ambler moleküler sınıflamasına göre A ve D'de sınıflandırılmaktadır (8).

Oksasilinaz enzimlerinin alt grubu olarak tanımlanmakta olan grup 2df içerisindeki enzimler bazı karbapenemler için zayıf etkinlikte olmakla birlikte

karbapenemaz aktivitesi göstermektedir (8). Sefalosporinleri hidrolize edebilen bu grup üyeleri klasik inhibitörlerle inhibe olmazlar veya klavulanik asit ve etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile zayıf inhibisyona uğrayabilirler (55,56).

İlk OXA kodlayan gen 1985 yılında, Birleşik Krallık'ta bir *Acinetobacter baumannii* izolatında tespit edilmiş ve *bla*$_{\text{OXA-23}}$ olarak tanımlanmıştır (57). Oksasilinaz-23, OXA-24/40, OXA-51 ve OXA-58 gibi klinik ile ilişkili karbapenem hidrolize edici bu grup β-laktamazlar en sık *A. baumannii'*de bulunmaktadır (58). Zaman içerisinde de *Enterobacteriaceae* ailesinde OXA-23 benzeri, OXA-48 benzeri, OXA-40 benzeri, OXA-51 benzeri ve OXA-58 benzeri olmak üzere pek çok OXA aile üyesi tespit edilmeye başlamıştır (57). Bunlardan OXA-48 ilk olarak Türkiye'de 2001 yılında 54 yaşında üriner sistem enfeksiyonu ve cilt yanığı olan bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* izolatında saptanmış ve sonrasında Türkiye'de nozokomiyal salgınlara neden olmaya başlamıştır (56).

Oksasilinaz-48 *Enterobacteriaceae*'da görülen başlıca OXA tipi karbapenemaz enzimidir (55). Penisilinlere karşı yüksek düzeyde hidrolitik aktiviteye sahipken karbapenemleri hidroliz etme yeteneği düşüktür. Karbapenemler arasında ise ertapenemle kıyaslandığında meropenemi ve imipenemi hidrolize edebilme yeteneği daha düşük seviyededir. Oksasilinaz-48'in keşfinden sonra bir ila beş aminoasitte yer değişikliği ve/veya dört aminoasit delesyonu gibi değişiklikler sonucu β-laktam hidroliz spektrumu farklılaşmış OXA-48 varyantları tespit edilmeye başlamıştır. Oksasilinaz-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247, OXA-370, OXA-405 OXA-48'den türemiş başlıca varyant enzimlerdir (56). Beta-Laktamaz DataBase sistemine göre 96 farklı OXA-48 benzeri enzim tespit edilmiştir (59).

Ambler sınıf A ve B'de yer alan karbapenemazlara kıyasla karbapenemler için zayıf hidrolitik aktivite göstermeleri bu enzimlerin fenotipik olarak saptanmasını da güçleştirmektedir. Karbapenem direnç geni taşıyan bu izolatlar karbapenemlere duyarlı olarak saptanabilmektedir. Dolayısıyla karbapenem tedavisine rağmen hastada iyileşme görülmeyebilir (59). Tespit edilmesindeki bu zorluk, tedavide yanıtsızlığa neden olmaları ve aynı zamanda plazmid kaynaklı oldukları için toplum içinde hızla yayılmaları endişe yaratmaktadır (60).

Alt grup 2f β-laktamazlar moleküler sınıf A'da yer alan ve aktif bölgelerinde serin taşıyan karbapenemazlardır (8). *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Not metalloenzyme carbapenemase (NmcA), Imipenem hydrolyzing β-lactamase (IMI), *Serratia marcescens* enzyme (Sme) ve Guiana extended-spectrum β-lactamase (GES) tip başlıca bu grupta yer alan enzimlerdir (50). Grubun çoğunluğunu oluşturan KPC enzimi ilk olarak 1996 yılında Amerika'da tespit edilmiş ve sonrasında ülke genelinde yayılmıştır (55).

Mevcut enzimlerin çoğu kromozom kaynaklı olmakla birlikte (*E.cloacae* ve *S.marcescens*'teki Nmc-A, Sme-1, Sme-2, Sme-3, IMI-1) *K. pneumoniae* 'daki KPC-1 ve *P.aeruginosa*'daki GES-2 ise plazmid kaynaklı kodlanmaktadır (8,51). Karbapenemler, penisilinler, aztreonam, oksiimino-sefalosporinler ve sefamisinler başlıca etki ettikleri antibiyotikler olup klavulanik asit veya boronik asit tarafından inhibisyona uğramaktadırlar (8,55).

2.4.3.Grup 3 Metallo- β-Laktamazlar

Metallo-β-laktamazlar, aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunduran, karbapenemleri hidrolize etme yeteneğine sahip enzim grubudur (8). New Delhi metallo-β-lactamase, Imipenemase (IMP), Verona integron-encoded metallo-β-lactamase (VIM) bu grupta yer alan başlıca karbapenemazlar olup aztreonam hariç bütün β-laktamları hidrolize edebilirken EDTA ve dipikolinik asit ile kolayca inhibe olabilmektedirler (56). Class 1 integronlarla ilişkili olan IMP enzimleri genellikle gen kaseti içinde diğer antibiyotik direnç genlerini de (Aminoglikozid direnç genleri: aacA4, aadA1, aadB; kloroamfenikole direnç geni: catB; diğer β-laktamaz genleri: OXA vb.) içerebilmektedir (61).

Metallo-β-laktamaz enzimine sahip *Pseudomonas* suşlarıyla salgınlar bildirilirken *Enterobacteriaceae* ailesinde çok sık görülmemektedir. Günümüzde *Enterobacteriaceae* suşlarıyla epidemik ve sporadik vakalar bildirilmektedir. Imipenemase ve VIM özellikle Yunanistan, Japonya ve Tayvan'da endemik olarak tespit edilmektedir (55). İlk plazmidik MBL 1991 yılında Japonya'da bir *P.aeruginosa* suşundan izole edilmiştir (51). New Delhi metallo-β-lactamase-1 enzimi ise ilk olarak İsveç'te Hindistan'a sık seyahat eden bir hastada 2007 yılında saptanmış ve bu genin Hindistan'dan kaynaklandığı tespit edilmiştir. Hindistan başta olmak üzere Pakistan,

Birleşik Krallık, İtalya ve Umman'dan da çok sayıda bu direnç genine sahip suş izole edilmiştir (55).

Aminoasit dizilimindeki farklılıklar ile enzim yapısı değişerek çeşitli varyantlar oluşmaktadır. Başlıca güncel varyantlar arasında VIM (VIM-2, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45), IMP (IMP-48, IMP-49), NDM-16 yer almaktadır (55).

2.5.KARBAPENEMAZ TESPİT YÖNTEMLERİ

Porin kaybı nedeniyle zar geçirgenliğinde azalma, antibiyotik dışa atım pompalarının etkinleşmesi ve karbapenemaz enzimlerinin varlığı başlıca karbapenem direnç mekanizmalarını oluşturmaktadır (3). Bu mekanizmalardan karbapenemaz enzim üretimi tüm beta-laktamlara karşı dirence yol açabilmesi ve çoğunun plazmidler gibi aktarılabilen hareketli genetik elemanlar tarafından kodlanmaları sebebiyle hızla yayılabildiği için ayrı bir öneme sahiptir (62).

Karbapenemaz üreten izolatların tanımlanabilmesi için karbapenem grubu antibiyotiklere karşı duyarlılığı azalmış şüpheli izolatların doğru seçimi oldukça önemlidir. Çünkü karbapenemaz üreten bazı mikroorganizmalar EUCAST tarafından önerilen klinik sınır değerlerden daha düşük minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerine sahip olabilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda şüpheli izolatların, karbapenemaz üretiminin doğrulanması açısından ileri incelemeye alınması önerilmektedir (63).

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemlerden (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem) birinde EUCAST tarafından belirlenmiş epidemiyolojik sınır değerlerin üzerinde bir MİK tespit edilirse karbapenemaz varlığı açısından taranması önerilir. Karbapenemaz üretiminin saptanmasında ertapenemin duyarlılığı yüksek olmasına rağmen özgüllüğü düşüktür. Buna karşı duyarlılık ve özgüllük dengesi göz önüne alındığında meropenem tercih edilmesi gereken antibiyotiktir. Yapılan manuel veya otomatize sistem duyarlılık testlerinde karbapenem duyarlılığında azalma saptanan suşlarda karbapenemaz varlığını göstermek için fenotipik veya genotipik yöntemler kullanılabilmektedir. Kombinasyon disk testleri, karbapenem hidrolizini gösteren biyokimyasal (kolorimetrik) yöntemler, karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM), karbapenem hidrolizinin matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrofotometresi (MALDI-TOF MS)

ile saptanması, lateral akım yöntemleri başlıca kullanılabilen fenotipik yöntemlerdir (62). Bu yöntemlerin dışında gram pozitif ve karbapenemaz üretmeyen gram negatif bakterilerim üremesini engelleyen çeşitli maddelerin eklenmesiyle hazırlanmış olan, klinik örneklerden ve rektal taramalardan karbapenemlere dirençli bakterilerin hızlı tespitini sağlamak üzere geliştirilmiş kromojenik besiyerleri de mevcuttur (55). Modifiye Hodge testi ise duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması ve sonuçların değerlendirilmesinde yaşanan zorluklar nedeniyle artık önerilmemektedir (62). Özellikle GSBL veya AmpC β-laktamaz üretip aynı zamanda porin kaybı olan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında yalancı pozitiflik oranlarının oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (63).

2.5.1.Fenotipik Tespit Yöntemleri

2.5.1.1.Kombinasyon disk testi: Kombinasyon disk yönteminde çeşitli inhibitör ajanlarla kombine edilmiş meropenem disk veya tabletleri kullanılmaktadır (62). İnhibitör ajanla kombine edilerek güçlendirilmiş β-laktam diskinin inhibisyon zonu tek başına β-laktam disk zonu ile karşılaştırılarak kombine disk zon çapında anlamlı artış olup olmadığı değerlendirilmektedir (63).

Meropenem ile kombine edilmiş boronik asit ve türevleri (PBA ve 3-aminofenil boronik asit), dipikolinik asit, EDTA, kloksasilin ve temosilin başlıca kullanılan inhibitör ajanlardır. Bu ajanlardan boronik asit sınıf A karbapenemazlarla, dipikolinik asit ve EDTA sınıf B karbapenemazlarla sinerji göstermektedir. OXA-48 benzeri enzimler için spesifik bir inhibitör bulunmamakla beraber OXA-48 enzimine sahip olan suşlarda temosiline yüksek düzey direnç görüldüğü için fenotipik belirleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Kloksasilin ise AmpC üretimi ve porin kaybı nedeniyle ortaya çıkan karbapenem direncini karbapenemaz üretiminden ayırmada kullanılmaktadır (62).

Yapılan çalışmalar ile valide edilmiş olması, enzim sınıflandırılmasını sağlayan bir yöntem olması ve hazır ticari kitlerin temin edilebilmesi nedeniyle kombine disk yönteminin önemli avantajları vardır. Bununla birlikte yapım ve değerlendirme için 18 saatlik bir süreye ihtiyaç duyulması pratikte daha hızlı testlerin geliştirilmesini zorunlu kılmıştır (62).

2.5.1.2.Biyokimyasal (kolorimetrik) testler: Karbapenemaz üretiminin fenotipik gösterimi için kullanılan başlıca kolorimetrik testler CarbaNP (Carbapenemase Nordmann-Poirel), Blue-Carba ve β-CARBA testleridir (62).

Kolorimetrik testlerin ana prensibi karbapenemin hidroliz olması sonucu değişen ortam pH'sının kullanılan çeşitli indikatörler sayesinde renk değişimi ile gösterilmesi esasına dayanmaktadır. Her üç test de iki saat içerisinde karbapenem hidrolizi olup olmadığını gösterebilmektedir. (62)

2.5.1.3.Karbapenem inaktivasyon yöntemi: Bir karbapenem diskinin bakteri süspansiyonu ile inkübasyonu sonrası karbapenemaz üreten suşlarda antibiyotiğin enzim tarafından parçalanması ve etkinliğini kaybetmesi bu testin ana prensibidir (62).

Kolay uygulanabilirliği, maliyet açısından ucuz bir yöntem olması ve diğer fenotipik testlere iyi bir alternatif olması nedeniyle fenotipik yöntemlerle karşılaştırmaların yapıldığı çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Ancak alınan bakteri miktarı, inkübasyon süresi, kullanılan disk içeriği, besiyerinin kalınlığı ve inhibisyon zon çapının değerlendirilmesi gibi faktörlerin standardize edilmesi gerekmektedir. Daha kısa sürede sonuç verebilmesini sağlamak amacıyla yöntemin modifikasyonu ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (55).

2.5.1.4.Karbapenem hidrolizinin matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrofotometresi ile saptanması: Bakteri ve mantarların tanımlanmasında MALDI-TOF MS gerek araştırma laboratuvarlarında gerekse rutinde daha yaygın olarak kullanılmaktadır (55). Cihazın çalışma prensibinde kristalize moleküllerden oluşan matriks solüsyonu ile kaplı kurutulmuş bakteri sürüntüsü üzerine lazer atışı yapılmaktadır. Bu işlemden sonra incelenen mikroorganizmaya ait biyomoleküller iyonize olarak hareket etmekte ve elektrik ve/veya manyetik alandan geçerek tek bir sinyal kalıbı oluşturan detektöre ulaşmaktadır. Detektör tarafından alınan kütle spektrumları sisteme özgü yazılım sayesinde incelenerek veri karşılaştırılmakta ve eşleşme uyumuna göre tür tanımlaması yapılmaktadır (8).

Karbapenemaz tespiti ise araştırılacak olan bakteri ile karbapenemlerin karıştırılması sonucu kütle spektrumunda karbapenemlere özgü olan piklerdeki kaybolma veya yüksekliğinde azalma gibi değişikliklerin değerlendirilmesi ile yapılabilmektedir (62). Bu anlamda hem direk katı besiyerinden hem de kan kültüründen yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Bununla birlikte enzimin açığa çıkmasını sağlayacak hidrolitik solüsyonların kullanımı, test edilecek karbapenemin seçilmesi, inkübasyon süreleri gibi konularda optimizasyon ve validasyonu sağlayabilmek için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır (55).

2.5.1.5.Lateral akım yöntemleri: Lateral akım testleri immünolojik reaksiyon temelli yöntemler olup karbapenemaz enzimlerine karşı oluşturulmuş olan monoklonal antikorların nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve böylece antijen ile birleşmesi sonucu meydana gelen immün komplekslerin renk değişimi sonucu görünür hale gelmesi esasına dayanmaktadır (55,62).

Bu anlamda geliştirilen hızlı testlerden biri OXA-48 epitoplarının yakalanmasını sağlayan anti OXA-48 kaplı kolloidal altın nanopartiküllerinin yer aldığı nitroselüloz membrandan oluşan ve yaklaşık dört dakika içerisinde sonuç veren kart testtir (62). Bunun dışında KPC ve IMP enzimlerinin hızlı tespitini sağlamak üzere geliştirilmiş ticari immünokromatografik testler de mevcuttur (55).

2.5.2.Genotipik Tespit Yöntemleri

Karbapenemaz varlığının saptanmasında moleküler tabanlı yöntemler altın standart olarak kabul edilmektedir (57). Moleküler yöntemler ile bütün karbapenemaz genlerinin saptanabiliyor olması ve karbapenemaz tiplerinin ayırt edilebilmesi karbapenemaz tespitinde genotipik yöntemlerin başlıca avantajları iken maliyetlerinin yüksek olması, spesifik donanım ve deneyim gerektirmesi rutinde kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır (55,57). Geleneksel moleküler yöntem olan PCR bu amaçla en sık kullanılan moleküler yöntemdir. Geleneksel PCR yöntemiyle tek bir gen bölgesinin saptanabiliyor olması zaman alıcıdır. Bu nedenle yüksek duyarlılık ve özgüllükle sonuç veren zaman kazandırıcı bir yöntem olan ve tanımlanmış birçok karbapenemaz genini saptayan multipleks PCR sistemleri geliştirilmiştir (57). Karbapenemaz tipine özgü primerlerin varlığında multipleks PCR kullanarak bir ya da daha fazla *bla*$_{\text{VIM}}$,

bla$_{KPC}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-48}$ gibi sık görülen karbapenemaz tipleri yüksek duyarlılık ve özgüllükte saptanabilmektedir (55). Farklı primerler ve peptid nükleik asit probları kullanılarak farklı özgüllük ve duyarlılığa sahip modifiye yöntemler de geliştirilmiştir [Check-Direct carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (Check-Points, Wageningen, the Netherlands), Xpert Carba-R (Cepheid, Sunnyvale, California), EazyPlex SuperBug ID complete A/B (Amplex, Giessen, Germany) ve GenePOC technology (GenePOC, Quebec City, Canada)] (57,64). Mikroarray temelli ticari yöntemler [Verigene (Luminex, Austin, Texas) , BioFire FilmArray (Salt Lake City, Utah)] PCR testlerinden daha yüksek duyarlılıkla hedef genlerinin saptanmasına olanak sağlamaktadır (64).

Kültürde üreyen bakteri izolatlarından karbapenemaz geni tespiti için kullanılabilen PCR yöntemleri dışında klinik örneklerden (rektal sürüntü, nazal sürüntü, idrar, kan vb.) karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin kısa sürede tespit edilmesi amacıyla kullanılan yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip moleküler testler de (GeneXpert, Loop-mediated Isothermal Amplification Method with Hydroxynaphthol Blue Dye (LAMP- HNB), BioFire FilmArray) bulunmaktadır (57,64).

Kullanılan primerlerin saptadığı genler dışında yeni veya varyant genlerinin olması durumunda moleküler test sonuçları negatif olarak alınmaktadır. Bilinen direnç genleri dışında olası direnç mekanizmalarının tespit edilebilmesi için izolatın referans laboratuvara gönderilmesi ve tüm gen sekanslama gibi ileri genotipik araştırmaların yapılması gerekmektedir (55).

2.6.KARBAPENEMAZ TİPLERİNİN DAĞILIMI

Enterobacteriaceae'da karbapenem direncinden sorumlu olan karbapenemazlardan sınıf A içerisinde yer alan KPC ailesi *Enterobacteriaceae* ile ilişkili tüm karbapenemazların en geniş küresel dağılıma sahip olanıdır (65).

Klebsiella pneumoniae carbapenemase varlığı ilk olarak ABD'de 1990'lı yıllarda Kuzey Carolina'daki bir hastadan izole edilen karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşunda gösterilmiştir (3). Ardından yapılan çeşitli çalışmalarda ABD'nin çoğu eyaletinde KPC üreten *Enterobacteriaceae* suşları ile meydana gelen enfeksiyonlar rapor edilmiştir (65).

Avrupa'da ise KPC üreten *Enterobacteriaceae* suşları, Akdeniz ülkelerinde özellikle İtalya ve Yunanistan'da yüksek insidansa sahiptir. Hatta İtalya ve Yunanistan 2014-2015 yıllarında KPC için endemik bölge olarak belirlenen iki Avrupa ülkesi olmuştur. Bu iki ülkede farklı tipte karbapenemazlar da bulunmakla birlikte karbapenem direncinin en yaygın etiyolojisi olarak KPC gösterilmektedir. Asya'da ise özellikle Çin'den KPC enziminin tespit edildiğine dair çeşitli çalışmalar mevcuttur (65).

Metallo-β-laktamazlar ise ağrılıklı olarak Asya'da görülmektedir (65). İlk kez 1991 yılında Japonya'da tespit edilmiş olup ardından Tayvan, Singapur, Kore, Hong Kong, Çin gibi Asya ülkelerinde; Brezilya ve Kolombiya gibi Latin Amerika ülkelerinde; Avrupa'da ve ABD'de de saptanmıştır (3). Asya'da özellikle NDM tipi karbapenemazlar oldukça sıkıntı yaratmaktadır. Avrupa'da ise Romanya, Polonya ve Danimarka NDM açısından sık görülen bölgeler olarak izlenirken İspanya, İtalya ve Macaristan'da baskın olan VIM tipidir (65).

Imipenemase enzimleri ise Japonya, Çin, Avustralya, Güney Kore ve Tayvan'da daha sık gözlenmekle birlikte Türkiye, Brezilya, Lübnan ve ABD'den de az sayıda IMP enzimi üreten suş bildirilmiştir (61).

Oksasilinaz-48 tipi karbapenemaz ilk olarak Türkiye'de tespit edilmiştir (61). Ardından Türkiye'de OXA-48 benzeri enzim üreten *K. pneumoniae* klonlarıyla ilişkili nozokomiyal enfeksiyonlar görülmeye devam etmiştir (65). Sadece Avrupa'da değil günümüzde Orta Doğu, Asya, Afrika ve Güney Amerika gibi dünyanın pek çok bölgesinden OXA-48 ve varyantları bildirilmektedir (61,65). Avrupa'daki yayılımda IncL/M olarak adlandırılan 62 kb'lık konjugatif plazmidin sorumlu olduğu düşünülmektedir (61).

Oksasilinaz-48 ve varyantları ABD'de *Enterobacteriaceae*'da görülen karbapenem direncinin oldukça nadir bir nedeni iken Avrupa'da özellikle Akdeniz ülkelerinde oldukça sık tespit edilmektedir (65).

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.GEREÇLER

3.1.1.Çalışmaya Alınan Örnekler

SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 12.12.2020-01.08.2021 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen, tanımlamaları VITEK®MS (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa), karbapenem duyarlılıkları otomatize mikrodilüsyon sistemi VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) ile tespit edilmiş 50 tanesi kontrol suşu olmak üzere toplam 152 gram negatif bakteri (*Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*) izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışma SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM Etik kurulu tarafından HNEAH-KAEK 2021/KK/173 karar no ile onaylanmıştır (Bkz. EK 1).

3.1.2.Kullanılan Besiyerleri ve Malzemeler

1. %5 Koyun kanlı agar (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa)
2. İmipenem antimikrobiyal duyarlılık diski 10 µg (Bioanalyse, Türkiye; Beckton Dickinson, ABD)
3. Meropenem antimikrobiyal duyarlılık diski 10 µg (Bioanalyse, Türkiye)
4. Mueller Hinton II agar (Condalab, İspanya)
5. Triptik soy broth (Merck, Almanya)
6. Distile su
7. Etanol absollü >%99,5 (Tekkim, Türkiye)
8. VITEK® %0.45 saline (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa)
9. QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya)
10. Karbapenem ve Kolistin Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye)
11. *E. coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 suşu
12. *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 suşu
13. *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 suşu

3.1.3.Kullanılan Cihaz ve Aletler

1. Etüv
2. Otoklav
3. Buzdolabı
4. Hassas Terazi
5. Vorteks
6. McFarland cihazı (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa)
7. Mezür (250ml, 500 ml)
8. Balon Joje (250ml, 1000ml)
10. Steril petri kabı (90ml)
11. DNA & RNA free, steril, 1.5 ml mikrosantrifüj tüpü (İsolab, Türkiye)
12. Collection tubes (2ml) (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya)
13. Otomatik pipet (2-20µl, 5-50 µl, 20-200µl, 100-1000µl)
14. Steril tek kullanımlık plastik öze (1µl, 10µl)
15. Steril pamuk uçlu eküvyon
16. DNase, Rnase ve pyrogen free steril, filtreli pipet ucu (100 µl, 200µl, 1000µl, Mettler Toledo, ABD)
17. VITEK®MS (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa)
18. VITEK® 2 (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa)
19. CFX96 Real Time PCR System (BioRad Laboratories, ABD)
20. Isıtıcı blok (Thermo Scientific, ABD)
21. Santrifüj cihazı (Abbott, ABD)

3.2.YÖNTEMLER

3.2.1.Suşların Toplanması

Çalışmaya çeşitli klinik örneklerin kültürlerinde üremiş, MALDI-TOF MS (VITEK®MS) ile tanımlanmış ve antibiyotik duyarlılıkları otomatize sıvı mikrodilüsyon sistemi (VITEK® 2) ile çalışılmış olan 102 tanesi karbapenem grubu antibiyotiklerden (meropenem, ertapenem, imipenem) en az ikisine dirençli ve 50 tanesi karbapenem duyarlı olmak üzere toplam 152 adet *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşu

dahil edilmiştir. Moleküler tiplendirme ve fenotipik testler saf kültür olarak elde edilen (toplam 152 izolat) %20 gliserollü triptik soy broth (TSB) besiyerine stoklanarak -20°C'de saklanan suşlar ile yapılmıştır.

3.2.2.İzolatların Hazırlanması

Stok besiyerinden %5 koyun kanlı agara (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) ekim yapılarak canlandırılan taze günlük pasajlardan alınan bakteri kolonileri hem karbapenem direnç genlerinin saptanması amacıyla hem de fenotipik karbapenemaz tespit yöntemleri olan mCIM ve rCDM yöntemlerinin uygulanmasında kullanılmıştır. Fenotipik testlerin kalite kontrolünde *E. coli* ATCC 25922 kalite kontrol standart suşu kullanılmıştır. İzolatların McFarland ayarı [0.5 McFarland (1.5-2x10^8 koloni oluşturan birim; KOB/ml) ve 3.0 McFarland (9x10^8 KOB/ml)] Vitek Densichek (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) optik okuyucusu kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3.Besiyerlerinin Hazırlanması

Hızlı karbapenemez tespit yöntemi ve mCIM için Mueller Hinton agar besiyeri ve mCIM'de kullanmak üzere ek olarak TSB besiyeri hazırlanmıştır. Mueller Hinton agar hazırlamak için firma önerileri doğrultusunda Mueller Hinton II agar (Condalab, İspanya) toz besiyerinden 38 gram alınarak 1 litre distile su içerisinde karıştırılıp tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Sonrasında 1 atm basınçta 121°C sıcaklıkta 15-20 dakika otoklavda (Sanyo, Japonya) sterilize edilmiş ve 45-50°C'ye kadar soğutulmuştur. Hızlı karbapenemez tespit yöntemi için kalınlık 3 mm olacak şekilde 19 ml; mCIM için ise kalınlık 4 mm olacak şekilde 20-25 ml besiyeri 90 mm'lik plaklara dökülmüş ve kullanılıncaya kadar yapılış tarihi not edilerek +4 °C'de saklanmıştır.

Triptik soy sıvı besiyeri hazırlamak için Triptik soy broth (Merck, Almanya) toz besiyeri karışımı kullanılmıştır. Hazırlık aşamasında firma önerileri doğrultusunda 1 litre distile su içerisinde 30 gram toz karışım çözdürülmüştür. Çözelti homojen bir karışım elde etmek için benmaride bir miktar ısıtılmış ve iyice çalkalanmıştır. Sterilizasyon için 1 atm basınçta 121°C sıcaklıkta 15-20 dakika bekletildikten sonra soğutulmuş ve 2'şer ml olacak şekilde steril, kapaklı cam tüplere dağıtılmıştır. Kullanılıncaya kadar yapılış tarihi not edilerek +4 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.4.İzolatlardan Genetik Materyalin Elde Edilmesi

%5 koyun kanlı agara ekilerek canlandırılan karbapenem dirençli izolatlardan DNA elde edebilmek için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Almanya) kullanılmış olup işlemler üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

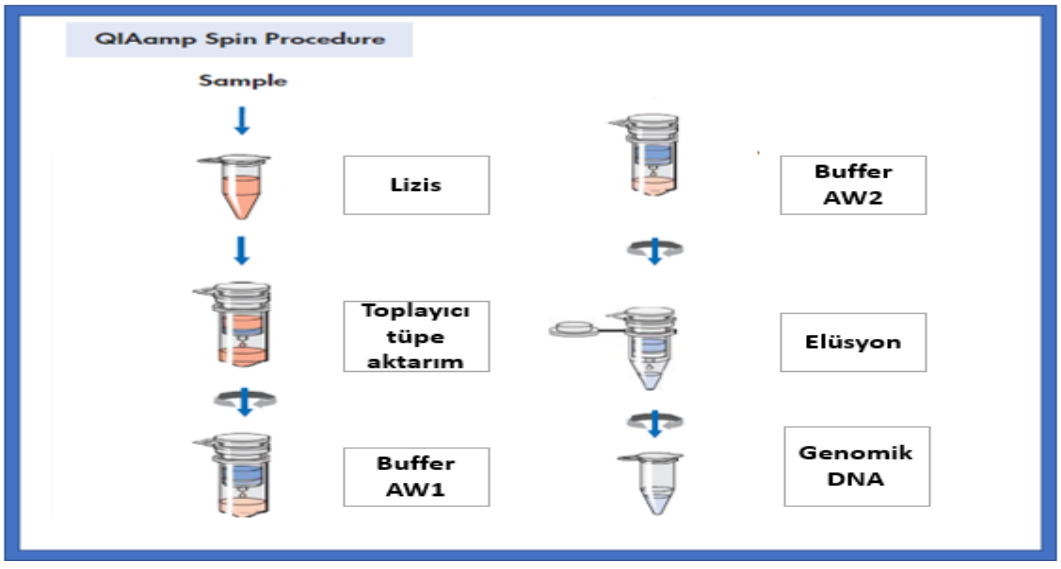
3.2.4.1.Ekstraksiyon test prosedürü: Her bir izolat için stok besiyerinden %5 koyun kanlı agara ekilerek hazırlanan taze kültürden steril öze ile bir miktar bakteri kolonisi alınarak kit içerisinde bulunan Buffer ATL solüsyonundan 180 µl konulmuş olan mikrosantrifüj tüpünde süspanse edilmiştir. Ardından her bir izolat için hazırlanan bu solüsyon içine 20 µl proteinaz K ilave edilip vortekslenmiş ve ısı bloğunda tamamen lizis olması için saatte üç kez vortekslenerek iki saat süreyle 56°C'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon bitiminde kapakta kalmış olabilecek damlaları düşürmek için kısaca santrifüjlenmiştir.

200 µl Buffer AL eklenen örnekler 15 sn vortekslendikten sonra 70°C'de 10 dakika inkübasyona alınıp sonrasında kısaca santrifüj edilmiştir. Ardından %99'luk etanolden 200 µl örneğe ilave edilerek alkol ve Buffer AL solüsyonunun iyice karışmasını sağlamak üzere tekrar kısaca santrifüjlenmiştir. Bu son iki aşamada örnekler içerisinde beyazımsı bir presipitat görülmesi kit prosedürü göz önüne alındığında normal olarak kabul edilmiştir. En son elde edilen karışım presipitat dahil kit içerisinden temin edilen QIAamp mini spin column olarak adlandırılan toplama tüpü (collection tube) içerisinde yer alan mini tüplere aktarılmış ve bir dakika boyunca 8000 rpm devirde santrifüj edilmiştir (Şekil 1). Mini tüpler filtrat içeren toplama tüplerinden alınarak temiz toplayıcı tüplere yerleştirilmiş ve her birine ilk yıkama solüsyonu olan 500 µl Buffer AW1 eklenmiştir. Karışım bir dakika boyunca 8000 rpm'de santrifüj edildikten sonra yine mini tüpler temiz toplama tüplerine aktarılmıştır. İkinci yıkama aşamasında ise her bir mini tüp içerisindeki karışıma 500 µl Buffer AW2 eklenerek üç dakika süresince 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Kit prosedür önerisine istinaden mini tüpler temiz toplama tüplerine aktarılmış ve olası Buffer AW2 kalıntılarını yok edebilmek için 14.000 rpm'de bir dakika daha santrifüj edilmiştir.



Şekil 1: Toplama tüpü (collection tube) ve içerisinde yer alan mini tüp

Yıkama aşamaları tamamlanan karışımı içeren mini tüpler toplayıcı tüplerden alınmış ve 1.5 ml mikrosantrifüj tüplerine yerleştirilmiştir. Ardından elüsyonu sağlamak üzere 200 µl Buffer AE ilave edilerek oda sıcaklığında bir dakika inkübe ettikten sonra 8000 rpm'de bir dakika santrifüj edilmiştir. Böylece ekstrakte edilen bakteri DNAsı mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarılmıştır (Şekil 2). Mikrosantrifüj tüpü içerisinde saf şekilde elde edilen bakteri DNAsı multipleks PCR kitinde kullanılmak üzere +4 °C'de bekletilmiştir. PCR işleminde kullanıldıktan sonra ise -20°C'de saklanmıştır.



Şekil 2: DNA ekstraksiyon prosedürü

3.2.5.Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenem Direnç Genlerinin Saptanması

QIAamp DNA Mini Kit ile saf şekilde ekstrakte edilen bakteri DNA'ları karbapenem direnç genlerinin saptanması ve tiplendirmelerinin yapılabilmesi için Karbapenem ve Kolistin Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye) ile işleme alınmıştır.

3.2.5.1.Polimeraz zincir reaksiyonu test prosedürü: Multipleks PCR kiti ile ilgili işlemler üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. İşlem sırasında her bir bakteri izolatı için toplam reaksiyon hacmi 20 µl olacak şekilde 8 kuyucuklu kapaklı strip tüplerinden 3 kuyucuk kullanılmıştır. İlk kuyucuğa detayları tablo 2'de belirtildiği üzere DNA polimeraz, dNTP karışımı ve reaksiyon tampon karışımından oluşan 2xqPCR miksinden 10 µl, ilk kuyucuğun hedef oligo miksi olan MCR oligo miksinden 5 µl ve elde ettiğimiz template nükleik asitten 5 µl ilave edilmiştir. İkinci kuyucuğa ilkinden farklı olarak hedef oligo miks için KPC, NDM, VIM, IMP karbapenem direnci oligo miksi ve üçüncü kuyucağa ise OXA-51, OXA23/58, OXA-48 karbapenem direnci oligo miksi ilave edilirken diğer reaktifler birinci kuyucukla aynı olacak şekilde eklenmiştir. Ayrıca her çalışmada ortam kontaminasyonunun kontrolü amacıyla negatif kontrol template ve her üç oligo miks için reaktif stabilite kontrolü amacıyla pozitif kontrol templateleri (PC-MCR, PC-CRE, PC-OXA) işleme alınmıştır.

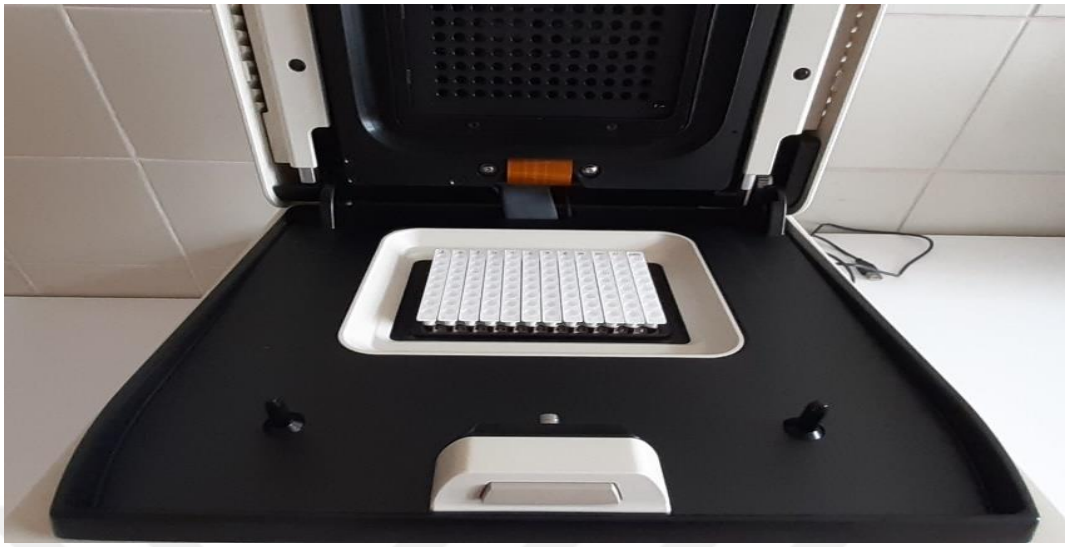
Tablo 2: Reaktiflerin strip kuyucuklarına dağıtımı

Reaksiyon içeriği	İçerik	Birim reaksiyon hacmi
Hedef Oligo Mix		5 µl
✓ **MCR 1-9- Kolistin direnci (FAM)**	MCR Oligo Mix (*MCR 1-9*)	
✓ **İnternal kontrol (RNase P geni) (HEX)**		
✓ ***KPC- Karbapenem direnci* (FAM)**	CRE Oligo Mix (*KPC, NDM, VIM, IMP*)	
✓ ***NDM- Karbapenem direnci* (HEX)**		
✓ **VIM- *Karbapenem direnci* (ROX)**		
✓ **IMP- *Karbapenem direnci* (*Cy5*)**		
✓ **OXA-51- *Karbapenem direnci* (FAM)**	OXA Oligo Mix (*OXA-51,OXA-23/OXA-58, OXA-48*)	
✓ **OXA-23/OXA-58- *Karbapenem direnci* (HEX)**		
✓ **OXA-48- *Karbapenem direnci* (*Cy5*)**		
DNA polimeraz, dNTP karışımı ve reaksiyon tamponu karışımı	2xqPCR Mix	10 µl
Template Nükleik Asit		5 µl
Toplam Reaksiyon hacmi		20 µl

Reaktifler belirtilen sıra ve miktarlarda striplere ilave edildikten sonra spin santrifüj edilip, tablo 3'te aşamaları belirtilen qPCR programına uygun şekilde ayarlanmış real-time PCR cihazına yerleştirilmiş ve PCR reaksiyonu başlatılmıştır (Şekil 3).

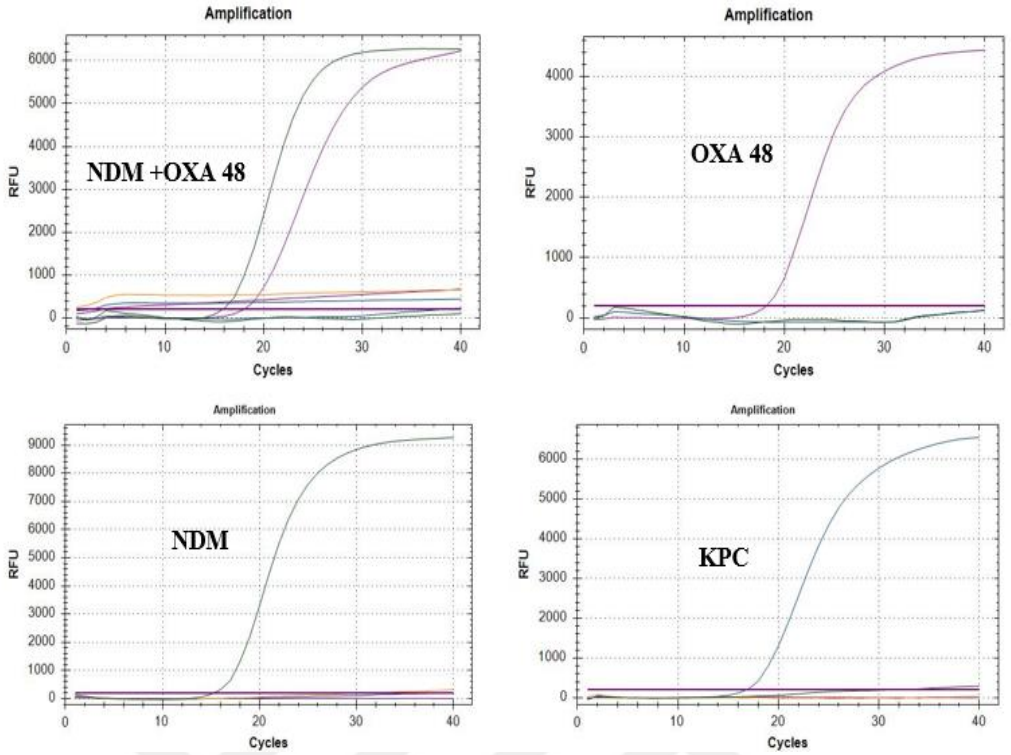
Tablo 3: qPCR programı

Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
1	95°C	300sn
40	95°C	1sn
	55°C	30sn
	FAM/HEX/ROX/Cy5 okuma	



Şekil 3: qPCR cihazına yerleştirilen 8'li stripler

3.2.5.2.Sonuçların değerlendirilmesi: Real time PCR cihazında reaksiyon tamamlandıktan sonra sonuçların yorumlanması aşamasına geçilmiştir. Öncelikle tüm kontrollerin geçerli olup olmadığı değerlendirilmiştir. Negatif kontrolün negatif (Cq yok), pozitif kontrollerin (Cq<38.0) ve internal kontrollerin pozitif olduğu örnekler için sonuçlar değerlendirmeye alınmıştır. Amplifikasyon eğrileri incelenerek threshold döngü sayısı (Cq)<38 sigmoidal eğriler pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 4). Karbapenem dirençli saptanmış olan her bir bakteri izolatının kit içeriğinde yer alan karbapenem direnç genlerini (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA23/58}$, *bla*$_{OXA-48}$) taşıyıp taşımadığı kayıt altına alınmıştır.

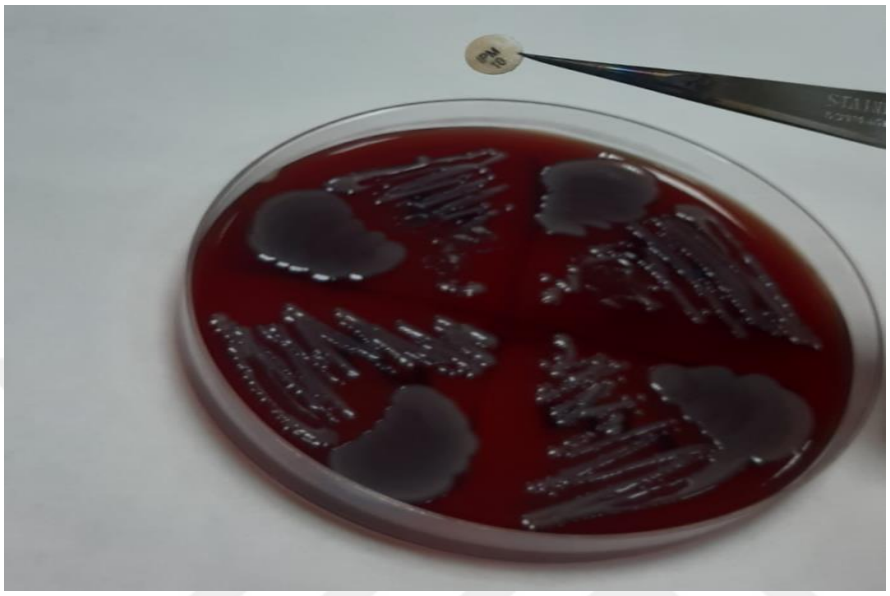


Şekil 4: Threshold döngü sayısı (Cq) <38 saptanan, pozitif olarak değerlendirilen sigmoidal eğriler

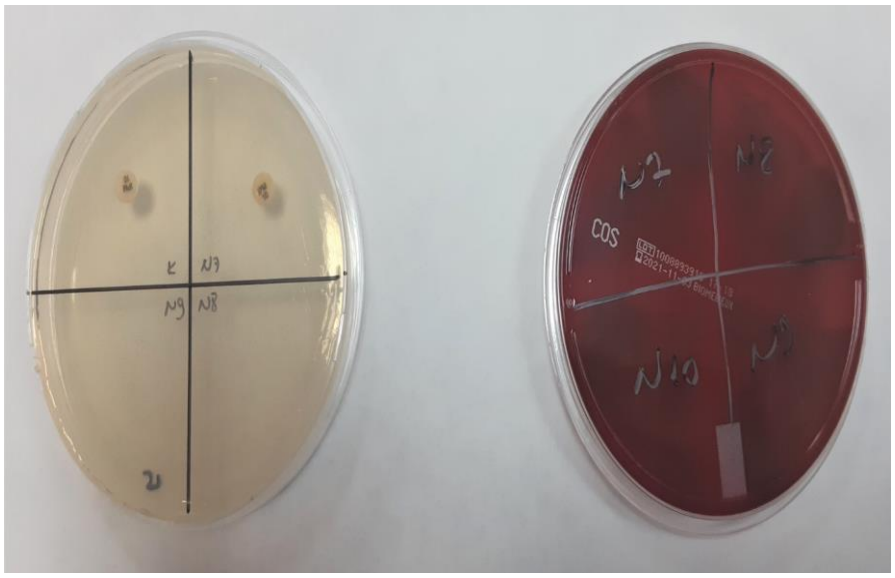
3.2.6.Hızlı Karbapenemaz Tespit Yönteminin Uygulanması

3.2.6.1.Test prosedürü: Jing ve ark. (2019) tarafından optimizasyonu yapılan rCDM testi için 3.0 McFarland yoğunlukta hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonu 3 mm kalınlıkta hazırlanmış olan ince Mueller Hinton agara disk difüzyon prosedürüne uygun olacak şekilde yayılmış ve 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. Test edilecek mikroorganizmanın stoğundan %5 koyun kanlı agara hazırlanmış olan taze kültür pasajından koloninin büyüklüğüne bağlı olarak bir-üç koloni 10 µg imipenem diskine (Bioanalyse, Türkiye ve Beck Dickinson, ABD) tüm yüzeyi kaplayacak şekilde ince bir katman halinde sürülmüş ve ardından hemen bakteri kaplı disk, yüzeyi aşağıya gelecek şekilde *E. coli* ATCC 25922 yayılmış olan Mueller Hinton agara yerleştirilmiştir (Şekil 5) (66). Her plağa üç adet test edilecek mikroorganizma ile kaplı imipenem diski ve kontrol amacıyla bakteri sürülmemiş imipenem diski olmak üzere toplam dört adet disk yerleştirilmiştir (Şekil 6). Ardından

bütün plaklar 35-37°C'de normal atmosfer basıncı altında beş-altı saat süreyle etüvde inkübe edilmiştir.



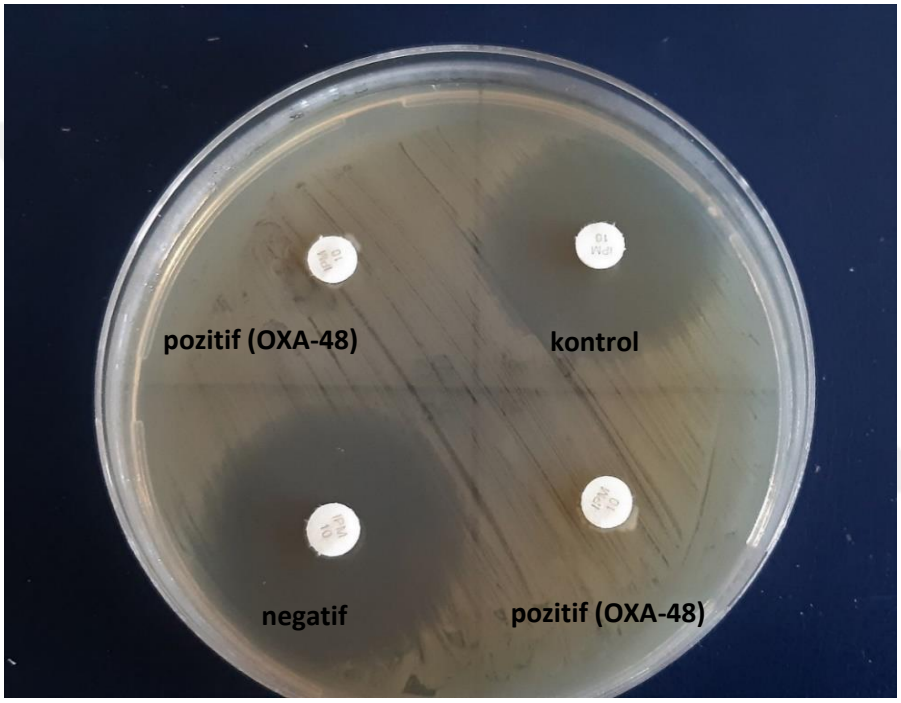
Şekil 5: Bakteri kolonisi ile kaplı imipenem diski



Şekil 6: İmipenem disklerinin agara yerleştirilmesi

3.2.6.2.Sonuçların değerlendirilmesi: İnkübasyona kaldırılan petriler, zon çaplarının değerlendirilmesi amacıyla inkübasyonun beşinci ve altıncı saatlerinde

dışarı çıkarılarak incelemeye alınmıştır. Hem kontrol diski hem de test edilen mikroorganizmaların sürülü olduğu disklerin etrafındaki zon çapları ölçülmüştür. Test edilen mikroorganizma ile kontrol arasındaki inhibisyon zon çapı farkının ≥5 mm olması bakterinin karbapenemaz ürettiğine işaret etmekteyken farkın ≤ 3mm olduğu sonuçlar karbapenemaz üretimi açısından negatif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 7). Sonucun 3-5 mm arasında olduğu durumlar ise belirsiz sonuç olarak yorumlanmış ve bu durumda test tekrarlanmıştır (66).



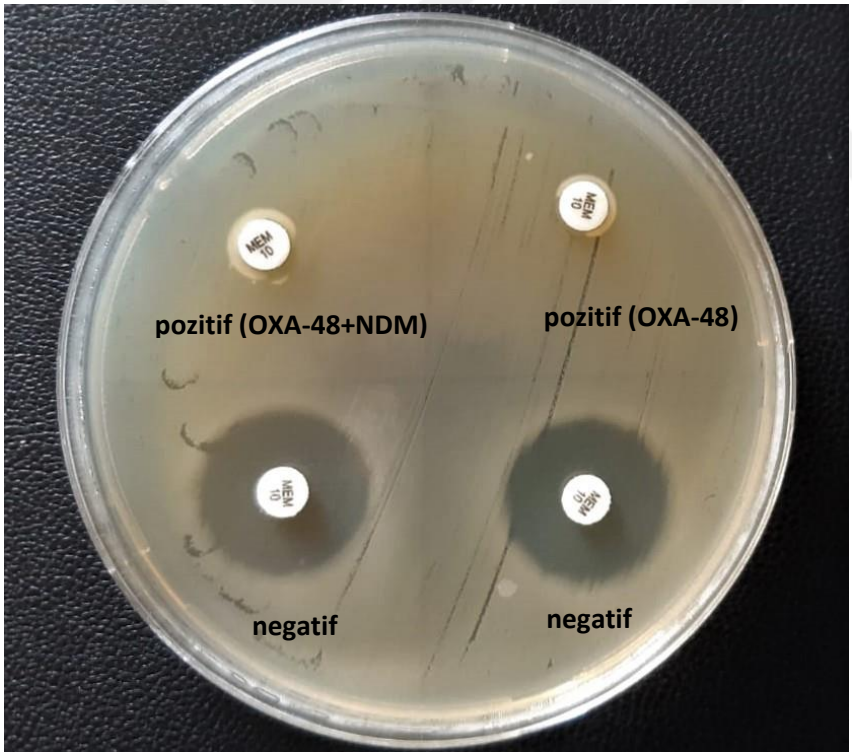
Şekil 7: *K. pneumoniae* için rCDM sonuçlarını değerlendirme (6.saat). Kontrol zon çapı 23 mm (sağ üst köşe); OXA-48 üreten iki pozitif izolat zon çapları 6 mm (sol üst ve sağ alt köşe); karbapenemaz üretimi olmayan izolat 23 mm (sol alt köşe)

3.2.7.Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi

3.2.7.1.Test prosedürü: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI, M100,2021) prosedürüne göre uygulanan mCIM testinde 2 ml TSB içeren tüpe 1µL öze dolusu test edilecek bakteri kolonisi ilave edilip 10-15 saniye vortekslenmiştir (67). Ardından steril bir şekilde 10 µg meropenem (Bioanalyse, Türkiye) diski tüp içerisine eklenip 35°C ± 2°C'de normal atmosfer basıncı altında dört saat inkübasyona

kaldırılmıştır. İnkübasyon sonunda 0.5 McFarland *E. coli* ATCC 25922 yayılmış Mueller-Hinton agar besiyerine tüp içerisindeki meropenem diski yerleştirilmiş ve 18-24 saat süreyle 35°C ± 2°C'de normal atmosfer basıncı altında etüvde inkübasyona kaldırılmıştır.

3.2.7.2.Sonuçların değerlendirilmesi: İnkübasyon sonrasında inhibisyon zon çapı 6-15 mm arasındaysa veya 16-18 mm zon çapına sahip olup alan içerisinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler varsa karbapenemaz pozitif olarak değerlendirilirken; ≥19 mm zon çapına sahip olan suşlar negatif olarak yorumlanmıştır (Şekil 8). İnhibisyon zon çapı 16-18 mm arasında olan veya zon çapı ≥19 mm olup alan içerisinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler içeren izolatlar ise karbapenemaz varlığı veya yokluğu açısından değerlendirilememiştir (67).



Şekil 8: *K. pneumoniae* için mCIM sonuçlarını değerlendirme (20.saat) OXA-48 üreten izolat 6 mm pozitif (sağ üst köşe); OXA-48+NDM üreten izolat 6 mm pozitif (sol üste köşe); karbapenem duyarlı iki izolat sırasıyla 19 ve 20 mm (sağ alt köşe, sol alt köşe)

3.2.8.Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması

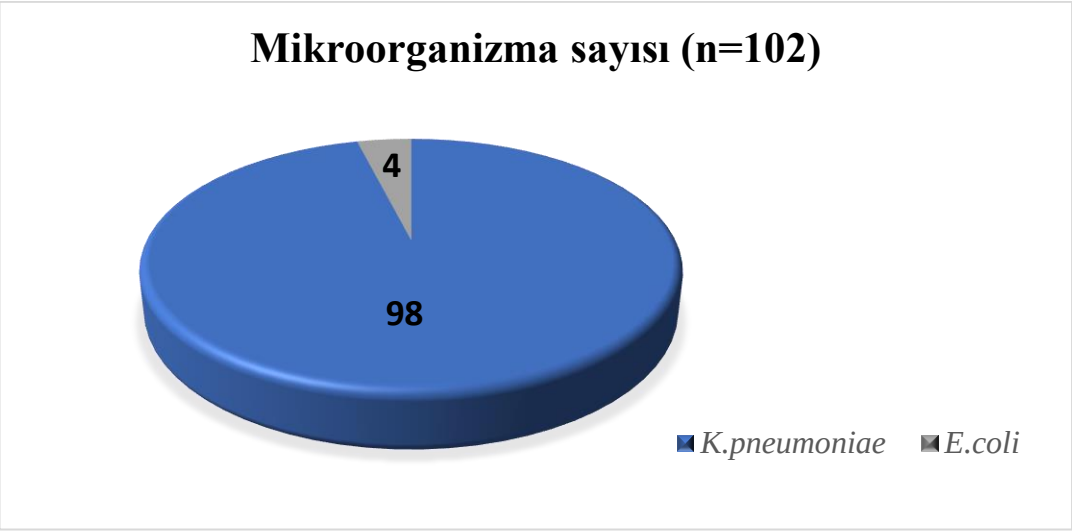
Hızlı karbapenemaz tespit yöntemi ve mCIM testinde kalite kontrol amacıyla *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (karbapenemaz pozitif) ve *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (karbapenemaz negatif) standart suşları kullanılmıştır.

3.2.9.Test Performansının Değerlendirilmesi

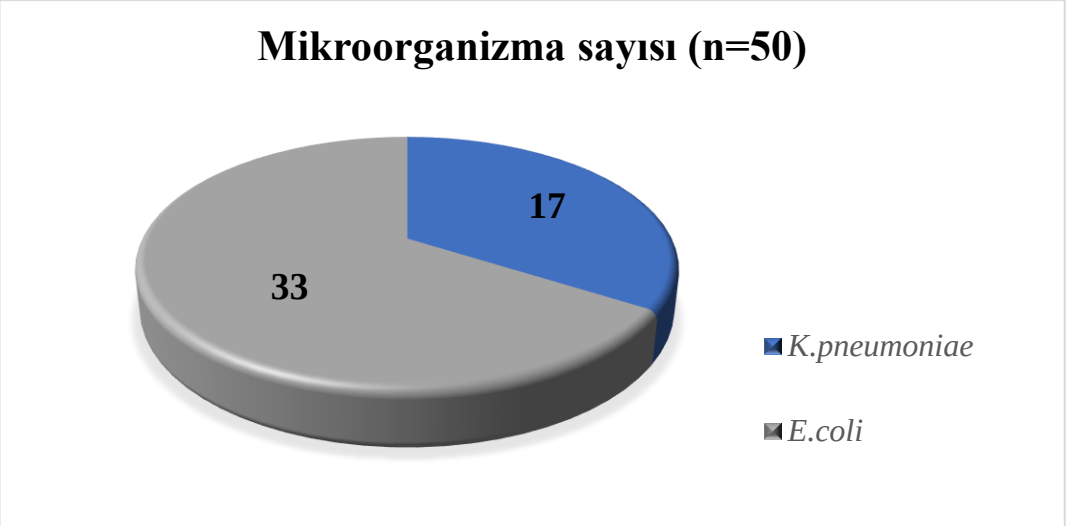
Yapılan istatistiki hesaplama sonucu %5 yanılma düzeyinde, 0,5 etki büyüklüğünde %95 güç düzeyine ulaşmak için en az 75 gözlem birimine ihtiyaç olduğu saptanmıştır. Toplanan izolat sayısı bu hesaplamaya göre belirlenmiştir. Hızlı karbapenemaz tespit metodunun duyarlılık hesabı PCR altın standart yöntem kabul edilerek yapılmıştır. Hızlı karbapenemaz tespit metodu ve mCIM yöntemleri arasındaki farkı incelemek için McNemar testi; tutarlılık derecelerini belirlemek için ise Cohen kappa analizi uygulanmıştır. Veri analizi SPSS 22.0 programı ile yapılmıştır. $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen deney grubunu oluşturan 102 ve kontrol grubunu oluşturan 50 izolatın dağılımı Şekil 9'da ve Şekil 10'da verilmiştir.

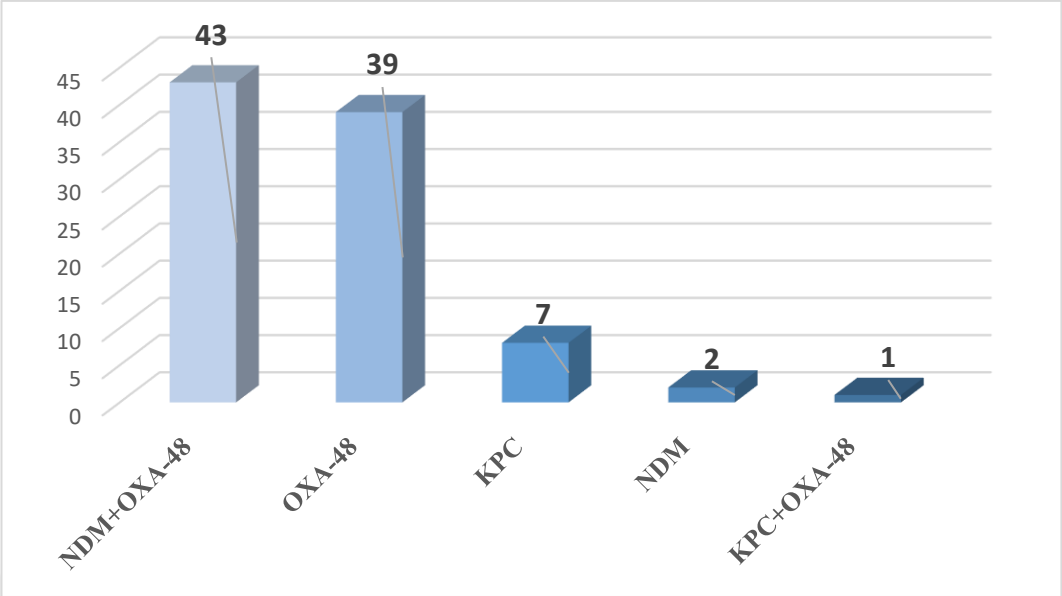


Şekil 9: Karbapenem dirençli izolatların dağılımı



Şekil 10: Karbapenem duyarlı izolatların dağılımı

Karbapenem direnç genleri araştırılan 102 izolatın yedisi *K. pneumoniae* ve üç tanesi *E. coli* olmak üzere 10 tanesinde PCR paneli içerisinde yer alan karbapenem direnç genleri (*bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA23/58}$, *bla*$_{OXA-48}$) tespit edilememiştir. Bu izolatlar istatistiki değerlendirmeye dahil edilmemiştir. En az bir direnç geni saptanan 92 izolatın 83'ünde *bla*$_{OXA-48}$ tespit edilmiştir. Direnç genlerinin dağılımına bakıldığında %46,7 ile en sık tespit edilen *bla*$_{NDM+OXA-48}$ birlikteliği iken %42,4'ünde sadece *bla*$_{OXA-48}$, %2,2'sinde sadece *bla*$_{NDM}$, %7,6'sında sadece *bla*$_{KPC}$ ve %1,1'inde *bla*$_{KPC+OXA-48}$ birlikte saptanmıştır (Şekil 11). Multipleks PCR paneli içerisinde yer alan *bla*$_{VIM}$, *bla*$_{IMP}$, *bla*$_{OXA-51}$, *bla*$_{OXA23/58}$ gen bölgelerinden hiçbiri çalışmamızda tespit edilmemiştir.



Şekil 11: Karbapenem direnç genlerinin dağılımı

Moleküler yöntemle karbapenem direnç geni taşıdığı tespit edilen 92 izolat, her iki fenotipik yöntemle de (rCDM ve mCIM) karbapenemaz pozitif olarak saptanmıştır (Tablo 4). Kontrol grubunda yer alan karbapenem duyarlı 50 izolata yapılan fenotipik karbapenemaz tespit çalışmalarında ise her iki yöntemle bütün suşlar karbapenemaz negatif olarak bulunmuştur (Tablo 5).

Tablo 4: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında rCDM ve mCIM ile karbapenemaz tespiti

	PCR	*rCDM (+)*	*rCDM (-)*	*mCIM (+)*	*mCIM (-)*
K. pneumoniae (91)	NDM+OXA-48 (43)	43	0	43	0
	OXA-48 (38)	38	0	38	0
	KPC (7)	7	0	7	0
	NDM (2)	2	0	2	0
	KPC+OXA-48 (1)	1	0	1	0
E. coli (1)	OXA-48 (1)	1	0	1	0

Tablo 5: Karbapenem duyarlı *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında rCDM ve mCIM ile karbapenemaz tespiti

	rCDM (+)	*rCDM (-)*	*mCIM (+)*	*mCIM (-)*
K. pneumoniae (17)	0	17	0	17
E. coli (33)	0	33	0	33

Hızlı karbapenemaz tespit yönteminde zon çaplarının karbapenem dirençli izolatlarda 6-19 mm, karbapenem duyarlı izolatlarda ise 20-24 mm arasında değiştiği saptanmıştır (Tablo 6). Zon çaplarının değerlendirilmesi beşinci ve altıncı saatlerde yapılmış olup, altıncı saatte yapılan değerlendirmenin daha net olduğu gözlenmiştir. Kalite kontrol amacıyla kullanılan *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (karbapenemaz pozitif) ve *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 (karbapenemaz negatif) standart suşlarının değerlendirilmesinde ise rCDM testinde zon çapları sırasıyla 6 mm ve 24 mm olarak ölçülmüştür.

Tablo 6: Karbapenem dirençli ve duyarlı izolatların rCDM ve mCIM test sonuçları

	Mikroorgaizma	rCDM test izolatı zon çapı (6.saat)	rCDM kontrol zon çapı (6.saat)	rCDM zon çapları farkı (6.saat)	mCIM test izolatı zon çapı (20.saat)	Sonuç
1	*K. pneumoniae*	18	23	5	6	*Pozitif*
2	*K. pneumoniae*	12	22	10	6	*Pozitif*
3	*K. pneumoniae*	15	23	8	6	*Pozitif*
4	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
5	*K. pneumoniae*	15	24	9	6	*Pozitif*
6	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
7	*K. pneumoniae*	15	22	7	6	*Pozitif*
8	*K. pneumoniae*	18	23	5	6	*Pozitif*
9	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
10	*K. pneumoniae*	6	22	16	12	*Pozitif*
11	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
12	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
13	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*

14	*K. pneumoniae*	18	23	5	12	*Pozitif*
15	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
16	*K. pneumoniae*	15	23	8	6	*Pozitif*
17	*K. pneumoniae*	18	24	6	6	*Pozitif*
18	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
19	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
20	*K. pneumoniae*	18	24	6	6	*Pozitif*
21	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
22	*K. pneumoniae*	17	24	7	6	*Pozitif*
23	*K. pneumoniae*	18	24	6	6	*Pozitif*
24	*K. pneumoniae*	16	24	8	6	*Pozitif*
25	*K. pneumoniae*	17	23	6	6	*Pozitif*
26	*K. pneumoniae*	15	23	8	6	*Pozitif*
27	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
28	*K. pneumoniae*	18	24	6	6	*Pozitif*
29	*K. pneumoniae*	18	23	5	6	*Pozitif*
30	*K. pneumoniae*	15	23	8	6	*Pozitif*
31	*K. pneumoniae*	14	22	8	6	*Pozitif*
32	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
33	*K. pneumoniae*	11	23	12	6	*Pozitif*
34	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
35	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
36	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
37	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
38	*K. pneumoniae*	16	24	8	6	*Pozitif*
39	*K. pneumoniae*	16	22	6	6	*Pozitif*
40	*K. pneumoniae*	12	22	10	6	*Pozitif*
41	*K. pneumoniae*	19	24	5	6	*Pozitif*
42	*K. pneumoniae*	11	22	11	6	*Pozitif*
43	*K. pneumoniae*	10	23	13	6	*Pozitif*
44	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
45	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
46	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
47	*K. pneumoniae*	17	23	6	6	*Pozitif*
48	*K. pneumoniae*	6	23	17	15	*Pozitif*
49	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
50	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
51	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
52	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
53	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
54	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
55	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
56	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*

57	*K. pneumoniae*	14	22	8	6	*Pozitif*
58	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
59	*K. pneumoniae*	12	24	12	6	*Pozitif*
60	*K. pneumoniae*	13	23	10	6	*Pozitif*
61	*K. pneumoniae*	6	24	18	12	*Pozitif*
62	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
63	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
64	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
65	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
66	*K. pneumoniae*	6	21	15	10	*Pozitif*
67	*K. pneumoniae*	6	21	15	6	*Pozitif*
68	*K. pneumoniae*	6	21	15	6	*Pozitif*
69	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
70	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
71	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
72	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
73	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
74	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
75	*K. pneumoniae*	17	22	5	6	*Pozitif*
76	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
77	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
78	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
79	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
80	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
81	*K. pneumoniae*	6	22	16	6	*Pozitif*
82	*K. pneumoniae*	15	22	7	6	*Pozitif*
83	*K. pneumoniae*	10	23	13	14	*Pozitif*
84	*E. coli*	6	25	19	6	*Pozitif*
85	*K. pneumoniae*	6	25	19	6	*Pozitif*
86	*K. pneumoniae*	11	25	14	6	*Pozitif*
87	*K. pneumoniae*	6	25	19	6	*Pozitif*
88	*K. pneumoniae*	6	24	18	10	*Pozitif*
89	*K. pneumoniae*	14	24	10	15	*Pozitif*
90	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
91	*K. pneumoniae*	6	23	17	6	*Pozitif*
92	*K. pneumoniae*	6	24	18	6	*Pozitif*
93	*K. pneumoniae*	23	22	-1	20	*Negatif*
94	*K. pneumoniae*	23	22	-1	19	*Negatif*
95	*K. pneumoniae*	22	22	0	20	*Negatif*
96	*K. pneumoniae*	22	22	0	20	*Negatif*
97	*K. pneumoniae*	22	22	0	20	*Negatif*
98	*K. pneumoniae*	22	22	0	20	*Negatif*
99	*K. pneumoniae*	21	22	1	19	*Negatif*

100	*K. pneumoniae*	21	22	1	21	*Negatif*
101	*E. coli*	21	22	1	20	*Negatif*
102	*E. coli*	21	21	0	20	*Negatif*
103	*E. coli*	21	21	0	20	*Negatif*
104	*E. coli*	20	21	1	20	*Negatif*
105	*E. coli*	20	21	1	20	*Negatif*
106	*E. coli*	21	21	0	19	*Negatif*
107	*K. pneumoniae*	20	21	1	20	*Negatif*
108	*E. coli*	20	21	1	20	*Negatif*
109	*E. coli*	21	21	0	19	*Negatif*
110	*E. coli*	20	21	1	19	*Negatif*
111	*E. coli*	21	21	0	19	*Negatif*
112	*E. coli*	21	21	0	20	*Negatif*
113	*E. coli*	21	21	0	19	*Negatif*
114	*E. coli*	21	21	0	21	*Negatif*
115	*E. coli*	21	21	0	19	*Negatif*
116	*K. pneumoniae*	23	23	0	22	*Negatif*
117	*E. coli*	23	23	0	22	*Negatif*
118	*E. coli*	23	23	0	21	*Negatif*
119	*K. pneumoniae*	22	22	0	21	*Negatif*
120	*E. coli*	22	22	0	22	*Negatif*
121	*E. coli*	22	22	0	21	*Negatif*
122	*E. coli*	22	23	1	21	*Negatif*
123	*E. coli*	22	23	1	21	*Negatif*
124	*E. coli*	22	23	1	21	*Negatif*
125	*E. coli*	23	23	0	22	*Negatif*
126	*E. coli*	23	23	0	21	*Negatif*
127	*E. coli*	23	23	0	22	*Negatif*
128	*E. coli*	23	23	0	22	*Negatif*
129	*K. pneumoniae*	23	23	0	21	*Negatif*
130	*K. pneumoniae*	23	23	0	21	*Negatif*
131	*K. pneumoniae*	23	23	0	21	*Negatif*
132	*E. coli*	23	23	0	21	*Negatif*
133	*K. neumoniae*	23	23	0	23	*Negatif*
134	*E. coli*	22	23	1	21	*Negatif*
135	*E. coli*	22	23	1	22	*Negatif*
136	*E. coli*	23	23	0	22	*Negatif*
137	*E. coli*	22	23	1	22	*Negatif*
138	*E. coli*	22	23	1	21	*Negatif*
139	*E. coli*	24	23	-1	20	*Negatif*
140	*E. coli*	21	22	1	23	*Negatif*
141	*K. pneumoniae*	21	22	1	22	*Negatif*
142	*K. pneumoniae*	22	23	1	19	*Negatif*

Hızlı karbapenemaz tespit yöntemi ile ilk çalışmada zon çapı farkı 4 mm olup indeterminant olarak değerlendirilen beş izolat sonrasında stoktan temiz pasaj alınarak yapılan tekrar çalışmasında karbapenemaz pozitif olarak saptanmıştır. Ayrıca zon çapı farkı 5 mm olup sınır değerde pozitif saptanan 14 izolatın altı tanesi için tekrar çalışması yapılmış ve ilk çalışma sonuçları ile uyumlu olarak pozitif sonuç elde edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları altın standart kabul edildiğinde rCDM yönteminin duyarlılığı %100 olarak hesaplanmıştır. Karbapenem duyarlı suşlara PCR uygulanamadığı için özgüllük hesabı yapılamamıştır. Fenotipik rCDM ve mCIM test sonuçlarının tümüyle uyumlu olduğu görülmüştür. İki test arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Tablo 7).

Tablo 7: 142 *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatının mCIM ve rCDM istatistik sonuçları

mCIM	**rCDM**	**rCDM**	***P*McNemar**	**Kappa**
	+	**-**		
+	92	0	1	1.00
-	0	50		

5.TARTIŞMA

Klebsiella pneumoniae ve *E. coli* çeşitli invaziv enfeksiyonlara sebep olabilen *Enterobacteriaceae*'da yer alan iki önemli mikroorganizmadır. Bu suşlarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotiklerin sıklıkla tercih edilmesi giderek artan karbapenem direnciyle karşılaşmamıza neden olmaktadır.

Karbapenem direncinde önemli bir yere sahip olan karbapenemaz enzimlerinin aktarılabilir genetik elemanlar tarafından kodlanması dirençli bakterilerin yayılımında önemli bir etkendir. Karbapenemaz üretimi olan suşlarla enfekte olan kişilerin erken tespit edilip gerekli izolasyon önlemlerinin alınması bu dirençli izolatların yayılımını önlemekte önemli bir basamaktır. Karbapenemaz genlerinin PCR ile tespit edilmesi

altın standart yöntemdir. Ancak hem pahalı hem de emek yoğun bir işlem olduğu için rutinde uygulanabilirliği sınırlıdır.

Karbapenemaz varlığının tespiti için farklı duyarlılık ve özgüllüklere sahip çeşitli fenotipik tespit yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden bazılarının sonuç verme sürelerinin uzun olması bazılarının ise pahalı ve ek malzeme ihtiyaçlarının fazla olması nedeniyle rutin uygulamalarda zorluk yaşanmaktadır. Ayrıca bu yöntemler ile farklı karbapenemaz genleri bulunan izolatlarda karbapenemaz pozitifliğinin saptanabilme oranları da değişmektedir. Hem hızlı hem de maliyet etkin bir yöntemle bölgesel olarak yaygın görülen karbapenemaz tipinin yüksek duyarlılık ve özgüllükle saptanması ÇİD izolatların yayılımını engellemekte önemlidir.

Türkiye genelinde karbapenemaz tiplerinin dağılımını araştıran çalışmalar incelendiğinde, OXA-48 pozitifliğinin genel olarak yüksek olduğu görülmektedir. Süzük ve ark. (68) tarafından yapılan çok merkezli çalışmada 2019 yılı içinde karbapenemlerden en az birine dirençli olan ve genotipik olarak direnç genine sahip olduğu gösterilen 207 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatı incelenmiştir. Karbapenemaz gen dağılımları $bla_{\text{OXA-48}}$ %52,2, bla_{KPC} %16,4, $bla_{\text{NDM-1}}$ %15, $bla_{\text{NDM-1+OXA-48}}$ %12,6, $bla_{\text{KPC+NDM-1}}$ %2,8 bla_{VIM} %0,5, $bla_{\text{VIM+OXA-48}}$ %0,5 olarak saptanmıştır.

Iraz ve ark.'nın (69) 2015 yılında yayınladıkları, Türkiye'de karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında β-laktamaz gen dağılımı ile ilgili yaptıkları çalışmada 37 karbapenem dirençli izolatın 36'sının en az bir karbapenemaz geni taşıdığı saptanmıştır. Bu izolatlardaki gen dağılımına bakıldığında 30'unun $bla_{\text{OXA-48}}$, dördünün $bla_{\text{NDM-1}}$ ve iki tanesinin $bla_{\text{OXA-48+NDM-1}}$ taşıdığı tespit edilmiştir. Çalışmada diğer direnç genleri saptanmamıştır.

Tekintaş ve ark.'nın (13) 2017 yılında yayınladıkları çalışmada 2015-2016 yılları arasında izole edilen 54 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunun 33'ünde $bla_{\text{OXA-48}}$, ikisinde $bla_{\text{NDM-1}}$ ve 19'unda $bla_{\text{OXA-48+NDM-1}}$ birlikte saptanmış olup araştırdıkları diğer gen bölgelerinden (bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{SIM}) hiçbiri tespit edilmemiştir.

Davarcı ve ark. (70) tarafından yapılan, karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında CIM testi ve modifiye hodge testinin karşılaştırıldığı çalışmada PCR ile direnç geni gösterilen 64 karbapenem dirençli suş incelenmiştir. En sık karşılaşılan beş gen bölgesinin ($bla_{\text{OXA-48}}$, bla_{KPC}, bla_{IMP}, $bla_{\text{VIM-1}}$, $bla_{\text{NDM-1}}$) araştırıldığı çalışmada 36

suşta *bla*$_{\text{OXA-48}}$, 18 suşta *bla*$_{\text{NDM-1}}$, sekiz suşta *bla*$_{\text{OXA-48+NDM-1}}$, bir suşta *bla*$_{\text{OXA-48+KPC}}$ ve bir suşta *bla*$_{\text{VIM-1}}$ tespit edilmiştir.

Demiray ve ark.'nın (4) karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarında CIM testinin kullanımı ile ilgili yaptıkları çalışmada 64 adet karbapenem dirençli izolatta karbapenemaz kodlayan beş gen bölgesi (*bla*$_{\text{OXA-48}}$, *bla*$_{\text{KPC}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{VIM-1}}$, *bla*$_{\text{NDM-1}}$) araştırılmıştır. Bu izolatların 27'sinde *bla*$_{\text{NDM-1}}$, 20'sinde *bla*$_{\text{OXA-48+NDM-1}}$, 11'inde *bla*$_{\text{OXA-48}}$ ve birinde *bla*$_{\text{KPC}}$ tespit edilmiştir. Beş izolatta (%7,8) araştırılan beş gen bölgesinden hiçbiri tespit edilmemiştir.

Aydemir ve ark. (71) tarafından yapılan karbapenem dirençli *Enterobacterales* suşlarında beş yıllık sonuçların değerlendirildiği, karbapenemaz genlerinin Gene-Xpert sistem Carba R kiti ile araştırıldığı çalışmada, *bla*$_{\text{NDM-1}}$ pozitifliğinin (%34,4) *bla*$_{\text{OXA-48}}$ kadar (%38,8) yüksek olduğu ve *bla*$_{\text{OXA-48+NDM-1}}$ birlikteliğinin de yüksek saptandığı (%15,5) görülmüştür. Çalışmada izolatların %3,2'sinde araştırılan karbapenemaz genlerinden hiçbiri tespit edilememiştir. Bizim çalışmamızda da 102 izolatın 10 tanesinde (%9,8) karbapenemaz geni saptanamamıştır. PCR ile %10'lara varan oranda tiplendirme yapılamayan izolatların varlığı gen saptama çalışmalarında daha geniş panelle çalışılması gerektirdiğini düşündürmektedir.

Özger (72) tarafından yapılan 318 gram negatif bakterinin dahil edildiği çalışmada belirgin olarak saptanan *bla*$_{\text{OXA-48}}$ pozitifliği (%27,6) yanı sıra *bla*$_{\text{OXA-48+NDM}}$ (%7,1), *bla*$_{\text{VIM+OXA-48}}$ (%8,1) ve *bla*$_{\text{OXA-48+IMP}}$ (%7,1) gibi gen birlikteliklerinin tespit edilmesi dikkat çekmektedir. Bu çalışmadan farklı olarak bizim çalışmamızda tek başına *bla*$_{\text{OXA-48}}$ (%42,4) pozitifliğinden daha yüksek oranda *bla*$_{\text{OXA-48+NDM}}$ birlikteliği (%46,7) saptanmıştır. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında (%5,5-35,2) saptadığımız yüksek oranlar bölgemiz kozmopolit yapısı ile ve izolatların nispeten daha yakın zamanda toplanan suşlardan oluşması ile açıklanabilir (4,13,68–70,73). Özger'in çalışmasından farklı olarak çalışmamızda yanlızca bir izolatta *bla*$_{\text{KPC+OXA-48}}$ (%1,1) saptanmış diğer karbapenemaz birliktelikleri saptanmamıştır.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ülkemizde OXA-48 pozitifliği yanı sıra NDM pozitifliğinin ve birden fazla gen birlikteliğinin arttığını göstermektedir. Fenotipik karbapenemaz tespit metodlarının hem farklı karbapenemaz geni taşıyan hem de birden fazla karbapenemaz geni taşıyan izolatlarda karbapenemaz varlığını yeterli

duyarlılık ile saptayabilmesi önem arz etmektedir. Bu nedenle yeni yöntem arayışları ve test modifikasyonları ile ilgili çalışmalar süregelmektedir. Bu amaçla yeni geliştirilen testlerden biri mCIM testinden uyarlanmış olan basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon yöntemidir (sCIM) (74). Bu yöntemde Jing ve ark. (74) mCIM testinden farklı olarak bakteriyi antibiyotik diskiyle birlikte inkübe etmemiş bakteriyi direk antibiyotik diskine sürüp sonra 0.5 McFarland yoğunlukta *E. coli* ATCC 25922 standart suşu yayılmış Mueller-Hinton agar besiyerine yerleştirmişlerdir. 35°C'de 16-18 saat inkübasyon sonrası zon çapları değerlendirilmiştir. Basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon yönteminde mCIM'den farklı olarak meropenem yerine karbapenemaz enzimi ile daha hızlı hidrolize olduğunu tespit etmeleri üzerine imipenem diski kullanmışlardır. Toplam 196 *Enterobacteriaceae,* 73 *A. baumannii,* 158 *P. aeruginosa* suşu değerlendirilmiştir. Moleküler olarak 196 *Enterobacteriaceae* suşunun 147'sinin karbapenemaz geni taşıdığı tespit edilirken fenotipik tespit metodları ile (sCIM ve mCIM) 148 izolatta pozitiflik saptanmıştır. Yapılan PCR sonrası yalancı pozitif olarak değerlendirilen izolatın CTX-M-15 taşıdığı tespit edilmiştir. Testler arası uyuma bakıldığında sCIM ve mCIM arası uyumun çalışmamızdaki sonuçlarla benzer olarak %100, PCR ile ise %99,5 olduğu saptanmıştır. Çalışmadaki karbapenemaz tiplerinin dağılımına bakıldığında $bla_{\text{OXA-48}}$'e sahip sadece iki izolat olduğu görülmektedir. Dolayısıyla sCIM yönteminin ülkemizde sık olarak olarak saptanan $bla_{\text{OXA-48}}$ pozitif izolatlardaki başarısını daha iyi değerlendirebilmek için daha fazla sayıda $bla_{\text{OXA-48}}$ pozitif izolatla çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bu yöntemi uygulamak için gerekli olan materyal sayısının az olması, uygulanabilirliğinin kolay olması birer avantaj olmakla birlikte sonuç verme süresinin oldukça uzun olması dezavantajdır.

Jing ve ark. (66) sCIM testini denedikten sonra daha erken sonuç almalarını sağlayan ve aynı tekniği baz alarak rCDM olarak adlandırdıkları yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Bizim de çalışmamızda kullanmış olduğumuz bu yöntemde sCIM testinden farklı olarak 3.0 McFarland yoğunlukta hazırlanmış *E. coli* ATCC 25922 standart suşu 3 mm kalınlıktaki Mueller-Hinton agar besiyerine yayılarak bakteri sürülmüş imipenem diski yerleştirilmiş ve zon çapları 5-6 saat sonra değerlendirilmiştir. Araştırıcılar rCDM testini valide edebilmek için 257 *Enterobacteriaceae,* 20 *A. baumannii,* 236 *P. aeruginosa* suşu kullanmışlardır. 200'ü

karbapebemaz üreten, 57 tanesi karbapenemaz üretmeyen toplam 257 *Enterobacteriaceae* suşunun istatistiksel değerlendirmesinde rCDM testinin duyarlılığı %100, özgüllüğü %99,6 olarak saptanırken mCIM ile aralarındaki uyum %100 olarak tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş olup PCR testi referans alındığında rCDM testinin duyarlılığı %100 ve mCIM ile aralarındaki uyum %100 olarak hesaplanmıştır. Ancak çalışmamızın bir kısıtlılığı olarak karbapenem duyarlı olan kontrol grubunda PCR ile karbapenemaz gen varlığı araştırılamadığından testin özgüllüğü hakkında yorum yapılamamıştır. Ayrıca karbapenem duyarlı grupta rCDM testi ile hiç yalancı pozitiflik saptanmamış olmakla birlikte kontrol grubunda yer alan izolatların ek direnç mekanizmasına sahip olmayan duyarlı suşlardan seçilmiş olması kısıtlayıcı bir faktör olabilir. Yine araştırılan gen bölgeleri saptanmayan karbapenem dirençli 10 izolatımızda direncin farklı bir karbapenemaz enzim pozitifliği nedeniyle mi yoksa enzim dışında karbapenem direnci gelişmesine sebep olan diğer (yüksek düzey AmpC ve geçirgenlikte azalma vb.) mekanizmalarla mı geliştiğine dair inceleme yapılmamış olduğundan bu izolatlardaki pozitiflik ile ilgili de yorum yapılamamıştır. Tek başına $bla_{\text{OXA-48}}$ ve $bla_{\text{NDM+OXA-48}}$ tiplerinin sayıca fazla olduğu çalışmamızda rCDM testi ile elde edilen yüksek uyum oranları ülkemizde sık gözlenen karbapenemaz tipi olan $bla_{\text{OXA-48}}$'de de başarılı sonuç alınabileceğini ve yöntemin rutinde kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak çalışmamızda kullanılan bakteri çeşitliliği (*K. pneumoniae, E. coli*) az olup daha fazla sayıda ve diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin de dahil edildiği çalışmalar yapılması yöntemin değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Fenotipik karbapenemaz tespiti için yapılan bir diğer çalışmada Muntean ve ark. (75) hızlı karbapenem inaktivasyon metodunu (rCIM) 113 tanesi retrospektif, 100 tanesi prospektif olarak toplanan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında değerlendirmiştir. Hızlı karbapenem inaktivasyon metodu CIM testi temel alınarak geliştirilmiş, uygulaması kolay ve yapım aşaması dahil ortalama üç saatte sonuç alınabilen bir testtir. Stok besiyerinden çözülerek hazırlanan 85'i karbapenemaz üreten, 28'i ise karbepenemaz üretmeyen 113 izolatta rCIM, CIM ve Carba NP testlerinin sonuçları karşılaştırılmıştır. Prospektif olarak toplanan 63 tanesi karbapenemaz üreten, 37 tanesi karbapenemaz üretmeyen 100 izolatta ise rCIM ve Carba NP sonuçları karşılaştırılmıştır. Retrospektif toplanan izolatlar için yapılan

değerlendirmede rCIM testinin CIM ve Carba NP testlerinden biraz daha yüksek duyarlılık (%99) ve özgüllüğe (%100) sahip olduğu gözlenmiştir. Prospektif çalışmada ise rCIM testinin Carba NP testine göre duyarlılığının daha yüksek olduğu (%98'e karşılık %92) ancak daha düşük özgüllüğe (%95'e karşılık %100) sahip olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamıza benzer şekilde rCIM testinin yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmektedir. Bizim uyguladığımız rCDM testinden daha kısa sürede sonuç verebilen ve aynı zamanda maliyet etkin bir yöntem olarak görülen bu yöntemde nefelometre, santrifüj gibi teknik cihazlara ihtiyaç olması ve hazırlık aşamasının birden fazla basamaktan oluşması testin rutinde uygulanabilirliğini zorlaştırabilecek nedenlerdir. Uygulama adımlarının rCDM testine kıyasla fazla olması özellikle aynı anda çok sayıda izolat ile çalışılması gerektiğinde işlem süresinin dolayısıyla sonuç alma süresinin uzamasına sebep olabilecektir. Ayrıca inoküle edilmesi gereken bakteri miktarının fazla olması (2x10µl) erken dönemde bu testin uygulanmasında sınırlayıcı bir faktör olarak karşımıza çıkabilir.

Benzer bir çalışma Liu ve ark. (76) tarafından yapılmış olup 55 tanesi retrospektif, 48'i prospektif değerlendirmeye alınan toplam 103 karbapenem dirençli izolata rCIM testi uygulanmıştır. Sekanslama altın standart metod kabul edilerek rCIM testinin performansı mCIM ve CNPt-Direct testi ile karşılaştırılmıştır. Araştırıcılar rCIM testinin duyarlılığını mCIM ve CNPt-Direct testinden daha yüksek bulmuş olmakla birlikte %96,8 ile bizim çalışmamızdan daha düşük bir duyarlılığa sahip olduğu göze çarpmaktadır. Mevcut çalışmada *bla*$_{\text{OXA-48}}$ genini taşıyan izolatın bulunmaması rCIM testinin *bla*$_{\text{OXA-48}}$ pozitif suşlarda kullanılabilirliği hakkında yorum yapılmasını zorlaştırmaktadır.

Hombach ve ark. (77) 2015 yılında yayınlanan çalışmalarında 51 tanesi karbapenemaz geni pozitif toplam 252 *Enterobacteriaceae* izolatında hızlı fenotipik karbapenemaz tespit yöntemi Rapidec Carba NP testini uygulamışlardır. Yaklaşık iki saat gibi kısa bir sürede sonuç veriyor olması avantaj olmakla birlikte yöntemin duyarlılığı çalışmamıza kıyasla daha düşük (%90,2) saptanmıştır. Test ile yalancı negatif sonuç veren beş izolatın dördünün *bla*$_{\text{OXA-48}}$ geni taşıdığı belirlenmiştir. Çalışmada sonuçlar yarım saatte okunduğunda saptanan duyarlılık (%49) inkübasyon süresinin uzatılması ve inokulum miktarının iki katına çıkarılması ile (%100) artmıştır. Bu nedenle araştırıcılar özellikle OXA-48 şüpheli izolatlarla çalışıldığında testin daha

yüksek inokulum ile çalışılması ve değerlendirmelerin ikinci saatte yapılması gerektiği önerisinde bulunmuşlardır. Gerek maliyet olarak bakıldığında gerekse OXA-48 tespitine yönelik başarısı göz önüne alındığında rCDM testi daha avantajlıdır.

Benzer bir çalışma Aktaş ve ark. (78) tarafından moleküler olarak karbapenemaz geni gösterilmiş 47 *Enterobacteriaceae,* 44 *A.baumannii* ve *9 P.aeruginosa* olmak üzere toplam 100 izolat ile yapılmıştır. Otuz altı izolat ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Çalışmada CIM testi ve Rapidec Carba NP sonuçları karşılaştırılmış ve *Enterobacteriaceae* için her iki testinde %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Oksasilinaz-48 enzimini tespitteki başarısı Hombach ve ark.'nın çalışmasından farklı olarak her iki test için de %100 olarak değerlendirilmiştir. Rapidec Carba NP hızlı, kolay ve güvenilir sonuçlar sunmakla birlikte farklı çalışmalarda değişen duyarlılık ve özgüllük oranlarının bildirilmesi ve görece pahalı bir yöntem olması rutinde kullanımını kısıtlamaktadır. Çalışmada CIM testinde karbapenemaz pozitifliğinin daha erken tespit edilebilmesi amacıyla yapılan altıncı saat okumalarında 24 saat sonuçları ile anlamlı bir fark olmadığı gözlenmiştir. Bu konuda daha fazla sayıda suş ile yapılacak çalışmalar hızlı yöntem arayışları açısından da faydalı olacaktır.

Yeni geliştirilen hızlı yöntemlerden bir diğeri Nordmann ve ark.'nın (79) 248 *Enterobacterales* izolatı ile yapmış oldukları ve 2020 yılında yayınlanan çalışmalarında bildirdikleri Nitrospeed-Carba NP testidir. Bu yöntem biyokimyasal karbapenemaz tespit yöntemleri temeline dayanan karbapenemaz varlığı yanı sıra karbapenemaz sınıfı (Ambler sınıf A, B, D) hakkında da yorum yapmayı sağlayan ve yaklaşık yarım saat içinde sonuç verebilen bir testtir. Testin duyarlılığı %100, özgüllüğü %97 olarak belirtilmiştir. Karbapenem sınıflarını ayırt edebilme başarısına bakıldığında ise sınıf A'yı %100, sınıf B'yi %97 ve sınıf D'yi %100 duyarlılık ile ayırt edebildiği gözlenmiştir. Duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek, güvenilir, kolay uygulanabilir hızlı bir test olması ve aynı çalışmada karbapenemaz tipinin de saptanabiliyor olması avantajına rağmen uygulama sırasında çok sayıda kimyasal maddeye ihtiyaç olması maliyeti arttırmaktadır. Benzer duyarlılık oranlarına karşın bu durum rCDM ile kıyaslandığında Nitrospeed-Carba NP testinin rutinde kullanımını kısatlamaktadır.

Petit ve ark.'nın (80) 137 karbapenemaz pozitif ve 22 karbapenemaz negatif *Enterobacterales* izolatı ile yapmış oldukları ve mCIMplus olarak adlandırılan yeni yöntemde sekiz saat içinde karbapenemaz üretimi ve 20 saat içinde karbapenemaz tipi (Ambler sınıf A, B, D) tespit edilmiştir. Bu yöntemde klasik mCIM testinden farklı olarak 1µl bakteri süspanse edilmiş TSB'ye meropenem diski ilave edilip dört saatlik inkübasyona kaldırılırken eş zamanlı olarak 0.5 McFarland yoğunlukta *E. coli* ATCC 25922 standart suşu yayılmış Mueller-Hinton agar besiyeri de *E. coli*'ye erken üreme fırsatı verecek şekilde inkübasyona kaldırılmış ve dört saat sonunda mCIM testi ile aynı prosedür uygulanmıştır. Dört saatlik inkübasyon süresinin sonunda sonuçlar değerlendirilmiştir. Karbapenemaz tipini belirlemek için ek olarak EDTA ve PBA kullanılmıştır. Testin performansına bakıldığında sekiz saatlik süre sonunda duyarlılık %99,3 iken 20 saat sonunda yapılan değerlendirmede %98,5 olarak tespit edilmiştir. Özgüllük ise zamandan bağımsız olarak %100 olarak bulunmuştur. Karbapenem sınıf ayrımı açısından duyarlılıklar ise sırasıyla Ambler sınıf A, B ve D için %100, %95, %100 olarak tespit edilmiştir. Uygulaması klasik mCIM ile oldukça benzer olan ama mCIM'e göre çok daha kısa sürede sonuç veren mCIMplus testinde rCDM'e kıyasla hazırlık aşamasında ek dört saate ihtiyaç olması ve toplamda sekiz saatte sonuç vermesi nedeniyle rCDM rutin uygulamada daha avantajlıdır. Ancak 20 saat sonunda karbapenemaz tipinin de belirlenebiliyor olması rCDM'e benzer yüksek duyarlılığa sahip mCIMplus testini öne çıkarmaktadır.

Son yıllarda MALDI-TOF MS teknolojisi ile fenotipik olarak karbapenem direnç piklerin saptanması ve/veya antibiyotikle muamele sonrası piklerin kaybolması temeline dayanan pek çok çalışma yapılmaktadır. Gelmez ve ark. (81) 2019 yılında yayınladıkları çalışmalarında 86'sı karbapenem dirençli toplam 106 suşu VİTEK-MS RUO (bioMérieux, Marcy-I'Étoile, Fransa) kullanarak bu metodla değerlendirmeye almışlardır. Çalışmada karbapenem dirençli suşların çoğunluğunun $bla_{\text{OXA-48}}$ genine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu yöntemde ertapenem piklerinde karbapenem dirençli ve duyarlı izolatlarla muamele sonrası bir değişiklik olup olmadığı değerlendirilmektedir. İki ve dört saatlik inkübasyonlar sonrası yapılan değerlendirmelerde özgüllük her iki saatte de %100 olarak saptanırken duyarlılık ikinci saatte %70,9, dördüncü saatte %83,7 olarak bulunmuştur. Hızlı karbapenemaz tespit yöntemine göre düşük bir duyarlılığa sahip olan bu yöntemin OXA-48 üretimini saptamaktaki başarısı da

oldukça zayıftır. Yapımı kolay ve kısa sürede sonuç veren bir yöntem olmasına karşın pahalı bir cihazla işlem yapılıyor olması laboratuvarlarda yaygın kullanımını kısıtlayıcı bir faktördür. Ayrıca ülkemizde yaygın karbapenemaz tipinin OXA-48 olması nedeniyle rutinde MALDI-TOF MS ile karbapenemaz tespiti için farklı modifikasyonlar yapılmasına ihtiyaç vardır.

Choquet ve ark. (82) tarafından karbapenemaz üretimi olan ve olmayan toplam 85 izolat ile yapılan diğer bir MALDI-TOF MS (MALDI Biotyper, Bruker Daltonics, Fransa) çalışmasında sonuçlar Rapidec Carba NP testi ile kıyaslanmıştır. Araştırıcılar bu çalışmada Gelmez ve ark.'ndan farklı olarak antibiyotik olarak imipenem solüsyonu kullanmışlardır. İmipenemin nativ halinin spektrumu ve bakteri ile muamele sonrası imipenem hidrolizi neticesinde oluşan spektrumlar değerlendirilerek karbapenemaz üretimi hakkında yorum yapılmıştır. Karbapenemaz üreten izolatların tip dağılımına bakıldığında *bla*$_{\text{OXA-48}}$ tipi çalışmamıza benzer şekilde oldukça yüksek sayıda (27/36) tespit edilmiştir ve testin duyarlılığı da yine bizim sonuçlarımızda olduğu gibi yüksek (%100) olarak izlenmiştir. Ayrıca karbapenemaz üreticisi olmadığı tespit edilen 49 izolat içerisinde ESBL, AmpC pozitif suşlar yer almakta olup özgüllük %94 olarak saptanmıştır. Rapidec Carba NP ve MALDI-TOF MS sonuçları ile yapılan karşılaştırmada Rapidec Carba NP testinin daha düşük duyarlılık (%92) ve özgüllüğe (%92) sahip olduğu tespit edilmiştir. Bir saatten az bir sürede ve %100 duyarlılıkla sonuç verebilmesi MALDI-TOF MS yönteminin önemli bir avantajı olmakla birlikte pahalı bir teknoloji olması ve dolayısıyla laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılamıyor olması bu tekniğin rutinde uygulanabilirliğini zorlaştırmaktadır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çoklu ilaç dirençli bakterilerin erken dönemde tespit edilerek hastaların uygun antibiyotiklerle tedavi edilmesi ve gerekli izolasyon önlemlerini alarak bu izolatların yayılımının engellenmesi giderek artmakta olan antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların azaltılmasında önemli bir basamaktır.

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde görülmekte olan karbapenem direncindeki artış göze çarpmaktadır. Özellikle *K. pneumoniae* suşlarıyla meydana gelen ÇİD enfeksiyonlar önemli bir sağlık sorunudur. Bu izolatların karbapenemaz

üreticisi olup olmadıklarını erken dönemde, hızlı, doğru ve maliyet etkin bir şekilde tespit edebilmek için çeşitli yöntemler geliştirilmektedir. Genotipik tespit metodları zahmetli ve pahalı yöntemlerdir ve rutinde tüm laboratuvarlarda uygulanması güçtür. Bu nedenle karbapenemaz üretimini göstermek için fenotipik tespit metodları ön plana çıkmaktadır. Literatürde bu amaçla farklı duyarlılık ve özgüllüğe sahip çok sayıda yöntem ile birçok çalışma yapıldığı görülmektedir. Bunlardan biri yeni geliştirilmiş bir metod olan rCDM testidir. Bu testin tüm laboratuvarlarda bulunabilecek malzemelerle yapılabiliyor olması, yüksek duyarlılığı, kabul gören fenotipik tespit yöntemi olan mCIM ile sonuçlarının uyumlu olması ve mCIM'e göre çok daha kısa sürede sonuç vermesi önemli avantajdır.

Çalışmamızda karbapenem dirençli izolatların karbapenemaz gen dağılımına bakıldığında %46,7 ile *bla*$_{NDM+\text{OXA-48}}$ birlikteliğinin sayıca en fazla olduğu ikinci sırada ise %42,4 ile *bla*$_{\text{OXA-48}}$ geldiği görülmektedir. Dolayısıyla tercih edeceğimiz fenotipik tespit metodunun bu iki gen bölgesine sahip izolatları saptamadaki başarısı önem arz etmektedir.

Çalışma kapsamına aldığımız 102 karbapenem dirençli izolatın 10 tanesinde araştırdığımız gen bölgeleri (*bla*$_{\text{KPC}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$, *bla*$_{\text{VIM}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$, *bla*$_{\text{OXA-51}}$, *bla*$_{\text{OXA23/58}}$, *bla*$_{\text{OXA-48}}$) tespit edilememiştir. Bu izolatlarda multipleks PCR kitiyle araştırdığımız sekiz gen bölgesinden farklı karbapenemaz gen bölgeleri olup olmadığı ayırt edilemediği için istatistiki hesaplamalarda değerlendirmeye dahil edilmemiştir.

Karbapenemaz üreticisi olduğu PCR ile gösterilmiş 92 izolatın tamamı rCDM ile pozitif olarak tespit edilmiş ve testin duyarlılığı %100 olarak belirlenmiştir. Kontrol grubu olarak seçilen karbapenem duyarlı 50 izolatın hiçbirinde rCDM ile pozitiflik saptanmamıştır. Yöntemler arası uyumu kıyaslamak amacıyla yapılan mCIM-rCDM karşılaştırmasında sonuçlar birbiri ile %100 uyumlu olup istatistiki olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir.

Uygulamanın oldukça kolay olması, hemen hemen bütün laboratuvarlarda bulunabilen malzemelerle yapılabilmesi, yaklaşık beş-altı saatte sonuç vermesi ve ülkemizde sık görülen OXA-48 tipini tespit etmedeki başarısı göz önüne alındığında rCDM yönteminin rutinde uygulanabilir bir fenotipik karbapenemaz tespit metodu olduğu sonucuna varılmıştır.

7.KAYNAKLAR

1. Jiang W, Yang W, Zhao X, Wang N, Ren H. Klebsiella pneumoniae presents antimicrobial drug resistance for β-lactam through the ESBL/PBP signaling pathway. Exp Ther Med. 2020;19(4):2449–56.
2. Ozgen AO, Eyupoglu OE. Antibiotic susceptibility of Klebsiella pneumoniae strains isolated from clinical samples. J Turkish Chem Soc Sect A Chem. 2020;7(1):319–30.
3. Karaaslan A, Soysal A. Karbapenemazlar. J Pediatr Infect. 2017;11(1):23–8.
4. Demiray T, Aydemir Ö, Kılıç Ü, Yılmaz K, Köroğlu M, Altındiş M. Karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae izolatlarında karbapenemaz saptanmasında karbapenemaz inaktivasyon testinin kullanımı. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2017;47(2):78–82.
5. Olalekan A, Onwugamba F, Iwalokun B, Mellmann A, Becker K, Schaumburg F. High proportion of carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae among extended-spectrum β-lactamase-producers in Nigerian hospitals. J Glob Antimicrob Resist. 2020;21:8–12.
6. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575–99.
7. Octavia S. The Family Enterobacteriaceae | SpringerLink [Internet]. [cited 2021 Mar 28]. Available from: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007%2F978-3-642-38922-1_167
8. Procop Gary W., Church Deirdre L., Hall Geraldine S., Janda William M., Koneman Elmer W., Schreckenberger Paul C. WGL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe baskı. 7. baskı. Prof. Dr.Ahmet Başustaoğlu PDADU, editor. Hipokrat yayınevi; 2017. 213–273, 1075–1160 p.
9. Reyes J, Aguilar AC, Caicedo A. Carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: Microbiology key points for clinical practice. Int J Gen Med. 2019;12:437–46.
10. Patel SS, Chauhan HC, Patel AC, Shrimali MD, Patel KB, Prajapati BI, et al. Isolation and identification of Klebsiella pneumoniae from sheep-case report. Int J Curr Microbiol Appl Sci. 2017;6(5):331–4.
11. Ashurst J V., Dawson A. Klebsiella Pneumoniae - StatPearls - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2021 Mar 28]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/
12. Yiş R, Bayram DE, Ergin ÖY. BlaOXA-48 pozitif K. pneumoniae izolatlarında fenotipik karbapenemaz üretiminin modifiye hodge ve karbapenemaz inaktivasyon testleri ile değerlendirilmesi. Namık Kemal Tıp Derg. 2020;8(1):1–10.
13. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SŞ, Limoncu MH. Klinik Klebsiella pneumoniae izolatlarinda karbapenemaz üretiminin saptanmasinda polimeraz zincir

reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul. 2017;51(3):269–76.
14. Kahraman EP, Karakeçe E, Erdoğan F, Uluyurt H, Köroğlu M, Çiftci İH. Klebsiella pneumoniae izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi. Ortadoğu Tıp Derg. 2017;9(1):12–8.
15. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of Klebsiella pneumoniae. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.
16. Paczosa MK, Mecsas J. Klebsiella pneumoniae: Going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–61.
17. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of Klebsiella pneumoniae. Microbiol Spectr. 2016 Apr 19;4(1).
18. Podschun R, Ullmann U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589–603.
19. Vading M, Nauclér P, Kalin M, Giske CG. Invasive infection caused by Klebsiella pneumoniae is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. PLoS One. 2018;13(4):e0195258.
20. Chung PY. The emerging problems of Klebsiella pneumoniae infections: Carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiol Lett. 2016;363(20).
21. Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Crit Care . 2014;18(2):208.
22. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, et al. Klebsiella pneumoniae bloodstream infection epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. Med (United States). 2014;93(17):298–308.
23. Tsay R-W, Siu LK, Fung C-P, Chang F-Y. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial Klebsiella pneumoniae infection. Arch Intern Med. 2002;162(9):1021–7.
24. Lee B, Yeroushalmi K, Me HM, Sojitra P, Jilani U, Iqbal S, et al. Community acquired Klebsiella pneumoniae meningitis: A case report. Germs. 2018;8(2):92–5.
25. Yu W-L, Chuang Y-C. Clinical features, diagnosis, and treatment of Klebsiella pneumoniae infection [Internet]. UpToDate. [cited 2021 Apr 19]. p. 1–38. Available from: https://www.uptodate.com/contents/clinical-features-diagnosis-and-treatment-of-klebsiella-pneumoniae-infection
26. Paterson DL, Siu KLK, Chang FY. Klebsiella species (K. pneumoniae, K. oxytoca, K. ozaenae and K. rhinoscleromatis) - Infectious disease and antimicrobial agents [Internet]. [cited 2021 Apr 19]. Available from: http://www.antimicrobe.org/b107.asp
27. Microbiology Legends | Clinical Case Studies | Thistle QA [Internet]. [cited 2022 Jan 7]. Available from: http://www.thistle.co.za/pathology-programmes/education/microbiology-legends/
28. Yu W-L, Chuang Y-C. Microbiology and pathogenesis of Klebsiella pneumoniae infection [Internet]. UpToDate. 2014 [cited 2021 Apr 19]. p. 1–22. Available from:

https://www.uptodate.com/contents/microbiology-and-pathogenesis-of-klebsiella-pneumoniae-infection/print?topicRef=3122&source=related_link

29. Lin WP, Wang JT, Chang SC, Chang FY, Fung CP, Chuang YC, et al. The Antimicrobial susceptibility of Klebsiella pneumoniae from community settings in Taiwan, a trend analysis [Internet]. Vol. 6, Scientific Reports. Nature Publishing Group; 2016 [cited 2021 May 1]. p. 1–11. Available from: http://dx.doi.org/10.1038/srep36280
30. Saha AK. Pattern of antimicrobial susceptibility of Klebsiella pneumoniae isolated from urinary samples in urinary tract infection in a Tertiary Care Hospital, Kishanganj, Bihar, 5 Years' experience. Int J Contemp Med Res [IJCMR]. 2019;6(12):25–8.
31. Håkonsholm F, Hetland MAK, Svanevik CS, Sundsfjord A, Lunestad BT, Marathe NP. Antibiotic sensitivity screening of Klebsiella spp. and Raoultella spp. isolated from marine bivalve molluscs reveal presence of CTX-M-producing K. pneumoniae. Microorganisms. 2020;8(12):1909.
32. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae. Int J Environ Res Public Health. 2020;17(17):6278.
33. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides : An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med. 2016;6(6):a027029.
34. Naeem A, Badshah SL, Muska M, Ahmad N, Khan K. The current case of quinolones: Synthetic approaches and antibacterial activity. Molecules. 2016;21(4):268.
35. Özkul Koçak C, Çetin Hazırolan G. Karbapeneme dirençli Klebsiella pneumoniae klinik izolatlarında kolistin direnci. Türk Mikrobiyoloji Cemiy Derg. 2019;49(1):17–23.
36. Cornelissen CN, Fisher BD, Harvey RA. Lippincott's illustrated reviews: Microbiology. Third. Harvey RA, editor. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer business; 2013. 111–115 p.
37. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A brief overview of Escherichia coli O157:H7 and its plasmid O157. J Microbiol Biotechnol. 2010;20(1):5-14.
38. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Murray Tıbbi Mikrobiyoloji (6.Baskı). 6th ed. C.Başustaoğlu A, editor. Ankara: Atlas Kitapçılık Tic.Ltd.Şti; 2010. 301–307 p.
39. Parvez SA, Rahman D. Virulence factors of uropathogenic E. coli | IntechOpen [Internet]. [cited 2021 Jun 25]. Available from: https://www.intechopen.com/books/microbiology-of-urinary-tract-infections-microbial-agents-and-predisposing-factors/virulence-factors-of-uropathogenic-e-coli
40. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic Escherichia coli virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. Int J Nephrol. 2012;2012:.
41. Carroll KC, Morse SA, Mietzner T, Miller S. Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology. 27th ed. McGraw-Hill Education; 2016. 234–236 p.
42. Sastry SA, Bhat S. Essentials of Medical Microbiology. 1th ed. Janagond A, editor. New Delhi, London, Philadelphia, Panama: Jaypee Brothers Medical Publishers Ltd; 2016. 299–

305 p.
43. Bennet JE, Dolin R, Blaser MJ. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of İnfectious Disease. 8th ed. John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser, editors. Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2015. 2509–2510 p.
44. Reygaert WC. Antimicrobial mechanisms of Escherichia coli | IntechOpen [Internet]. [cited 2021 Jun 26]. Available from: https://www.intechopen.com/books/-i-escherichia-coli-i-recent-advances-on-physiology-pathogenesis-and-biotechnological-applications/antimicrobial-mechanisms-of-i-escherichia-coli-i-
45. Shepherd AK, Pottinger PS. Management of urinary tract infections in the era of increasing antimicrobial resistance. Med Clin North Am. 2013;97(4):737–57.
46. Pormohammad A, Nasiri MJ, Azimi T. Prevalence of antibiotic resistance in Escherichia coli strains simultaneously isolated from humans, animals, food, and the environment: A systematic review and meta-analysis. Infect Drug Resist. 2019;12:1181–97.
47. Galindo-Méndez M. Antimicrobial resistance in Escherichia coli | IntechOpen [Internet]. 2020 [cited 2021 Jun 26]. Available from: https://www.intechopen.com/books/e-coli-infections-importance-of-early-diagnosis-and-efficient-treatment/antimicrobial-resistance-in-escherichia-coli
48. Beceiro A, Bou G. Class C β-Lactamases: An increasing problem worldwide. Rev Med Microbiol. 2004;15(4):141–52.
49. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):821–30.
50. Gauthier L, Dortet L, Cotellon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, et al. Diversity of carbapenemase-producing Escherichia coli isolates in France in 2012-2013. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62(8):e00266-18.
51. Bal Ç. Beta-Laktamazlar : Güncel Durum. Flora. 2003;8(2):111–23.
52. Dağlar D, Öngüt G. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilim Derg. 2012;1:1–9.
53. Jacoby GA. AmpC β-Lactamases [Internet]. Clinical Microbiology Reviews. 2009 [cited 2021 May 14]. p. 161–182. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2620637/
54. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of β-lactamases in antibiotic-resistant gram-negative infections. Crit Care. 2010;14:224.
55. Kılıç Ü, Demiray T, Altındiş M. Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. Ankem Derg. 2016;30(2):62–75.
56. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(4):587–604.
57. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and antimicrobial therapy. Front Microbiol. 2019;10:1823.
58. Akhtar A, Pemberton OA, Chen Y. Structural basis for substrate specificity and

carbapenemase activity of OXA-48 class D β-lactamase. ACS Infect Dis. 2020;6(2):261–71.
59. Rivera-Izquierdo M, Láinez-Ramos-Bossini AJ, Rivera-Izquierdo C, López-Gómez J, Fernández-Martínez NF, Redruello-Guerrero P, et al. OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacterales in Spanish hospitals: An updated comprehensive review on a rising antimicrobial resistance. Antibiotics. 2021;10(1):89.
60. Gurung S, Kafle S, Dhungel B, Adhikari N, Shrestha UT, Adhikari B, et al. Detection of OXA-48 gene in carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae from urine samples. Infect Drug Resist. 2020;13:2311–21.
61. Güran M. Karbapenemaz enzimleri: Türkiye'deki durum üzerine bir derleme. Turkiye Klin J Med Sci. 2016;36(2):98–105.
62. Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón Spain R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
63. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin Microbiol Infect. 2014;20(9):839–53.
64. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and diagnostics of carbapenem resistance in gram negative bacteria. Clin Infect Dis. 2019;69(7):S521–8.
65. Duin D van, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence. 2017;8(4):460–9.
66. 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;9:371.
67. EM100 Connect - CLSI M100 ED31:2021 [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI M100 ED31:2021&sbssok=CLSI M100 ED31:2021 TABLE 3B&format=HTML#CLSI M100 ED31:2021 TABLE 3B
68. Süzük Yildiz S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kiliç S, et al. Türkiye'de 2019 yılı içinde izole edilen Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae izolatlarında karbapenemaz epidemiyolojisi. Mikrobiyol Bul. 2021;55(1):1–16.
69. Iraz M, Düzgün AÖ, Sandallı C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A, et al. Distribution of β-lactamase genes among carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Turkey. Ann Lab Med. 2015;35(6):595–601.
70. Davarcı İ, Koçoğlu ME, Zengin F. Karbapenemaz üreten Klebsiella pneumoniae suşlarında karbapenem inaktivasyon testi ve modifiye hodge testinin karşılaştırılması. Klimik Derg. 2018;31(3):223–6.
71. Aydemir Ö, Köroğlu M, Ormanoğlu G, Ayhancı T, Şahin Özözen E. Karbapenem dirençli Klebsiella pneumoniae ve diğer Enterobacterales enfeksiyonları ; Beş yıllık değerlendirme. 36 ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Kitabı 44 nolu sözel Bildir. 2021;109–14.
72. Özger SH. Karbapenem dirençli Enterobacterales izolatlarında Seftazidim-Avibaktam

duyarlılıklarının değerlendirilmesi. 36ANKEM Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi Kitabı-68 nolu sözel Bildir. 2021;190–1.

73. Samasti M, Koçoğlu ME, Davarcı İ, Vahaboğlu H, Çaşkurlu H. Investigation of carbapenemase genes and clonal relationship in carbapenem resistant Klebsiella pneumoniae strains. Bezmialem Sci. 2019;7(3):186–90.
74. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S. The simplified carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of gram-negative bacilli. Front Microbiol. 2018;9:2391.
75. Muntean A, Gauthier L, Creton E, Cotellon G, Popa MI, Naas T. Evaluation of the rapid carbapenem inactivation method (rCIM): A phenotypic screening test for carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2018;73(4):900–8.
76. Liu Y, Luan L, Liu J, Nan W. Rapid carbapenem inactivation method (rCIM): A new phenotypic method for rapidly detecting carbapenemase-producing Enterobacterales [Internet]. Research square. 2020 [cited 2022 Jan 9]. Available from: https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-58147/v1
77. Hombach M, Von Gunten B, Castelberg C, Bloemberg G V. Evaluation of the rapidec Carba NP test for detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2015;53(12):3828–33.
78. Aktaş E, Malkoçoğlu G, Otlu B, Çiçek AÇ, Külah C, Cömert F, et al. Evaluation of the carbapenem inactivation method for detection of carbapenemase-producing gram-negative bacteria in comparison with the RAPIDEC CARBA NP. Microb Drug Resist. 2017;23(4):457–61.
79. Nordmann P, Sadek M, Demord A, Poirel L. NitroSpeed-Carba NP test for rapid detection and differentiation between different classes of carbapenemases in Enterobacterales. J Clin Microbiol. 2020;58(9):e00932-20.
80. Petit M, Caméléna F, Cointe A, Poncin T, Merimèche M, Birgy A, et al. Rapid detection and characterization of carbapenemases in Enterobacterales with a new modified carbapenem inactivation method, mCIMplus. J Clin Microbiol. 2020;58(11):e01370-20.
81. Altınkanat Gelmez G, Can B, Hasdemir U, Söyletir G. VITEK-MS sistemi ile karbapenemaz üretiminin hızlı tespiti. Ankem Derg. 2019;33(1):24–30.
82. Choquet M, Guiheneuf R, Castelain S, Cattoir V, Auzou M, Pluquet E, et al. Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018;37(1):149–55.