T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İSTANBUL ANADOLU KUZEY KAMU HASTANELERİ
GENEL SEKRETERLİĞİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

OXA-48 DİRENÇ GENİNİN TESPİTİNDE TEMOSİLİN DİSK TESTİ, ChromID OXA-48 AGAR EKİMİ, İMMUNOKROMOTOGRAFİK K-SET TESTİNİN KIYASLANMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. ERKAN SANMAK

EĞİTİM SORUMLUSU DOÇ. DR. SEBAHAT AKSARAY
TEZ DANIŞMANI DOÇ.DR. RIZA ADALETİ

İSTANBUL-2017

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
İSTANBUL ANADOLU KUZEY KAMU HASTANELERİ
GENEL SEKRETERLİĞİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM ve ARAŞTIRMA HASTANESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ

OXA-48 DİRENÇ GENİNİN TESPİTİNDE TEMOSİLİN DİSK TESTİ, ChromID OXA-48 AGAR EKİMİ, İMMUNOKROMOTOGRAFİK K-SET TESTİNİN KIYASLANMASI

UZMANLIK TEZİ

DR. ERKAN SANMAK

EĞİTİM SORUMLUSU DOÇ. DR. SEBAHAT AKSARAY
TEZ DANIŞMANI DOÇ.DR. RIZA ADALETİ

İSTANBUL-2017

TEŞEKKÜR

Uzmanlık öğrenimim süresince yanında eğitim almaktan gurur duyduğum, her yönüyle kendisini örnek aldığım değerli hocam Doç.Dr. Sebahat AKSARAY'a,

Tez çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, uzmanlık eğitimim boyunca her konuda bilgi, fikir ve desteğini esirgemeyen, kibarlığı ve karakteri ile herkese örnek olan değerli hocam Doç.Dr.Rıza ADALETİ' ye,

Öğrenimim süresince bilgi ve desteklerini gördüğüm uzmanlarıma,

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte güzel günler geçirdiğimiz, beraber bu zorlu süreci yaşadığım, asistan arkadaşlarım ve laboratuvar personeline,

Beni bugünlere getiren, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem ve babama,

Bana her zaman destek olan, sonsuz sevgisi ile hayatımı aydınlatan değerli eşim Ö.Damla Y. SANMAK'a, bundan sonraki hayatımın anlamı olacak olan Can'ım oğluma teşekkür ederim.

ÖZET

Klebsiella pneumoniae özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda morbidite ve mortaliteye neden olan bir patojendir. *Klebsiella pneumoniae*'da karbapenemaz direnci her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde görülen karbapenemaz kaynaklı direncin en sık nedeni sınıf D OXA-48 grubundadır. Bu sınıf karbapenemazın saptanmasında altın standart moleküler yöntem olmakla birlikte bu yöntemin pahalı ve zor ulaşılabilir olmasından dolayı moleküler dışı yöntemler ön plana çıkmaktadır. Bu tez çalışmasında OXA-48 direnç geninin tespitinde kullanılan moleküler dışı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmaya bir yıllık süreçte klinik örneklerden izole edilen toplam 45 karbapenemaz dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Tüm izolatlarda real time PCR, temosilin disk difüzyon testi, K-SET immunokromotografik yöntem ve ChromID OXA-48 agara ekim yapılmıştır. İstatistiksel Analizler IBM Statististics 20.0 (SPSS) ile yapılmıştır. Test sonuçları duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, toplam doğruluk oranı, ROC Curve analizi ile değerlendirilmiştir.

K-SET testi karbapenemaz dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarının saptanmasında altın standart test PCR ile %100 uyumlu bulunmuştur. ChromID OXA-48 agar yöntemi ile duyarlılık %100, özgüllük %88.8 olarak tespit edilmiştir. Temosilin disk difüzyon yönteminin ise duyarlılığı %100, özgüllüğü %77.8 bulunmuştur.

Test verileri değerlendirildiğinde immunokromotografik K-SET testi en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Diğer testlerin duyarlılıkları %100 olmasına rağmen yanlış pozitifliklerden dolayı özgüllükleri daha düşüktür. K-SET testinin OXA-48'in endemik olarak bulunduğu bölgelerdeki yoğun bakım hastalarının Gram (-) üremelerinde rutine girebileceği kanısındayız. Diğer taraftan ise ChromID OXA-48 agar ve temosilin disk difüzyon testinin KDKP yönünden tarama ve tanı algoritmasında bir basamak olarak kullanılabileceği düşüncesindeyiz. Ancak vaka sayımız kısıtlı olduğundan karbapenem

direncindeki diğer mekanizmaları da hızlı ve yüksek doğrulukta ortaya koyacak şekilde geniş kapsamlı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: Karbapenemaz, OXA-48, Klebsiella, Direnç, PCR

SUMMARY

Klebsiella pneumoniae is a pathogen that causes morbidity and mortality, especially in nosocomial infections. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* increases day by day. Most common cause of carbapenem resistance in our country is in class D OXA-48 group. This class is currently the gold standard molecular method for identification of carbapanemase but because of its cost and access difficulty, non-molecular methods come into prominence. In this thesis study, we aimed to analyze sensitivity and specificity of non-molecular methods which are used to identify OXA-48 resistance gene.

The study included 45 carbapenem resistant *Klebsiella Pneumoniae* strains that were isolated from clinical samples within one year period. Real time PCR, temocillin disc diffusion assay, K-SET immunochromatographic assay and inoculation in ChromID OXA-48 medium were performed with all isolates. Statistical analysis was run with Statistical Package IBM Statistics (SPSS) 20.0. Test results were evaluated according to results of sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, total accuracy rate and ROC curve analysis.

K-SET assay was found %100 compatible with gold standard PCR for identification of *Klebsiella pneumoniae* strains. %100 sensitivity and %88.8 specificity were found with ChromID OXA-48 medium method. Sensitivity and specificity of temocillin disc diffusion assay were found %100 and %77.8, respectively.

When test data was evaluated, immunochromatographic K-SET assay had the highest sensitivity and specificity. Even though other tests had %100 sensitivity, their specificities were lower due to false positivity. We believe K-SET assay can be used in routine for Gram (-) bacterial growth of intensive care patients in OXA-48 endemic-regions. On the other side, we think ChromID OXA-48 medium and temocillin disc diffusion assay might be used as a step for algorithm of screening and diagnosis for carbapenem resistant

Klebsiella Pneumoniae. However, since our sample is small, further larger studies that will reveal other mechanisms of carbapenem resistance in a faster and more accurate manner are required.

Key words: *Klebsiella,* carbapenem, resistance

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ. 1

GENEL BİLGİLER.....3

KLEBSİELLA PNEUMONİAE. 3

BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER. 6

ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI. 10

BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI.....12

BETA-LAKTAMAZLAR. 13

KARBAPENEMAZLAR. 16

KARBAPENEMAZ AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI. 20

MATERYAL-METOD.....26

KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE İDANTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK ÇALIŞMALARI.....28

GENOTİPİK TESTLER.....28

MOLEKÜLER DIŞI YÖNTEMLER İLE OXA-48 DİRENCİNİN TESPİTİTİ29

İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....31

BULGULAR.....32

TARTIŞMA 43

SONUÇ ve ÖNERİLER 49

KAYNAKLAR 50

KISALTMALAR

GSBL :Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

GN :Gram negatif

GP :Gram pozitif

MYSTIC :Meropenem yearly susceptibility test information collection

ICARE :Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology

KPC :*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MBL : Metallo beta lactamase

KDKP :Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae*

OXA :Oxacillin-hydroliyzing

SME :*Serratia marcescens* enzyme

NMC :Not metalloenzyme carbapenemase

IMI :Imipenem-hydrolyzing beta-lactamase

KPC :*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

VIM :Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase

SPM :Sao Paulo MBL

GIM :German imipenemase

NDM :New Delhi metallo-beta-lactamase

MRSA :Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

OMP :Outer membrane protein (Dış membran proteini)

DNA :Deoksiribonükleik asit

RNA :Ribonükleik asit

REE :Restriction endonuclease enzyme

YBÜ :Yoğun bakım ünitesi

GC :Genel Cerrahi

BC :Beyin Cerrahi

PCR :Polimeraz zincir reaksiyonu

PBP :Penisilin bağlayan protein

MİK :Minimum inhibitör konsantrasyon

MHT :Modifiye hodge test

CLSI :Clinical Laboratory Standards Institute

PFGE :Pulsed Field Gel Electrophoresis

EDTA :Etilendiamin tetraasetik asit

IMP :İmipenem

MEM :Meropenem

ETP :Ertapenem

IS :insertion sequence

DHP-I :Dihidropeptidasa

IMVIC : İndol, Metil red, Voges – Proskauer, Sitrat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İzolatların kliniklere göre dağılımı……...32

Şekil 2. İzolatların materyal türüne göre dağılımı……33

Şekil 3. PCR OXA-48 ile diğer üç testin birbiriyle kıyaslanması.....41

Şekil 4. Roc Curve……42

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. K-SET immunokromotografik yöntem.....30

Resim 2. ChromID OXA-48 besiyerinde üreyen E.coli ve K.pneumoniae.....31

Resim 3. RT PCR ile OXA-48 geninin araştırılması.....35

Resim 4. Temosilin disk difüzyon testinde dirençli saptanan suş.....36

Resim 5. Temosilin disk difüzyon testinde duyarlı saptanan suş.....37

Resim 6. K-SET testi negatif ve pozitif örnek.....38

Resim 7. ChromID OXA-48 Agar.....40

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. Klebsiella türleri.....4

Tablo 2. Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması……..…7

Tablo 3. 2016 CLSI Enterobacteriaceae için karbapenem sınır değerleri……..…….8

Tablo 4. Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması……..15

Tablo 5. Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri……..…17

Tablo 6. KDKP izolatlarının MİK değerleri……..34

Tablo 7. Temosilin disk difüzyon testinin verileri……..…….36

Tablo 8. K-Set testinin verileri……..……38

Tablo 9. ChromID OXA-48 agar verileri…….……39

Tablo 10. PCR OXA-48 ile moleküler dışı üç testin kıyaslanması…..40

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella pneumoniae halk sağlığını tehdit eden önemli bir enfeksiyon etkenidir. Özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarda morbidite ve mortaliteye neden olan bir patojendir (1).

Geçmişte *K.pneumoniae'nın* neden olduğu infeksiyonların tedavisinde hücre duvar inhibitörleri olan beta-laktam grubu antibiyotikler tercih ediliyordu. Fakat zamanla bu bakterilerin kazandığı direnç nedeniyle yeni tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir (2,3). Özellikle genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *K.pneumoniae* ciddi bir sorun oluşturmaktadır (4,5). GSBL üreten *K.pneumoniae* prevalansının bazı ülkelerde %50'lerin üstüne çıkması, karbapenem kullanımını vazgeçilmez hale getirmiştir (6,7).

Gram-negatif (GN) bakterilerde artan direnç oranları nedeniyle karbapanemlerin önemi artmıştır (5,8,9,10). Karbapenemler porin kanallarından geçtikten sonra penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak bakterisidal etki gösterirler (11,12**)**. Antibakteriyel spektrumları geniştir, aerop-anaerop mikroorganizmanın neden olduğu infeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır (13,14**)**. *K. pneumoniae*'nın karbapenemlere karşı direnci her geçen gün artmaktadır (15).

ABD'de yapılmış sürveyans çalışmasında, karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gen ailesinin ilk üyesi 1996'da izole edilmiştir (16).

Ülkemizde enterik GN bakterilerde sınıf D OXA karbapenemaz ile karbapenem direnci sıklıkla gözlenmektedir (17,18). Araştırmalarda enterik GN bakterilerdeki karbapenemaz direncinden çoğunlukla OXA-48 karbapenemaz aktivitesinin sorumlu olduğu saptanmıştır (19,20).

Karbapenemaz üreten GN bakteriler çoğunlukla diğer antimikrobiyallere de dirençli oldukları için *K.pneumoniae*'daki karbapenem direnci önem kazanmaktadır (22).

Bu nedenle direnç mekanizmalarının anlaşılması, erken teşhis, erken tedavi ve hasta izolasyonu açısından ileri çalışmaları gündeme getirmiştir. Moleküler yöntemlerin pahalı ve ulaşılabilirliğinin zor olması moleküler dışı yöntemlerin önemini arttırmıştır. Bu tez çalışmasında OXA-48 direnç geninin tespitinde kullanılan moleküler dışı yöntemlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

2.1.1. Genel Bilgiler

Friendlander basili olarak da bilinen *K.pneumoniae* hareketsiz, sporsuz, kısa ve uçları yuvarlak 1-2 µm boy ve 0,5-0,8 µm çapında basillerdir. Gram negatif, polisakkarit yapısında kapsüllü, aerop ve fakültatif anaerop özellik gösterebilen, 37°C ve pH 7'de iyi üreyebilen bakterilerdir.

Doğada sıklıkla bulunabilen bakteri; kuruluğa dirençli, sıcaklığa duyarlı, ancak oda sıcaklığında haftalarca ve +4°C'de aylarca canlı kalabilir (23).

2.1.2. Yaptığı Hastalıklar

Klebsiella spp.'ler nazofarinks ve barsakta kolonize olabilirler. Dışkı genellikle enfeksiyonların en önemli kaynağıdır (24). Hastaların yaklaşık olarak 1/3'ü dışkılarında *Klebsiella spp.*'yi taşır, fakat erişkinlerde hastaneye yatış ve antimikrobiyal kullanımı ile bu oran artabilir. Geçmişte *K.pneumoniae,* pnömoni gibi toplumdan kazanılmış enfeksiyonların önemli bir sebebi olarak düşünülmekteydi ancak son zamanlarda *K.pneumoniae* dünya çapında piyojenik karaciğer abselerinin önemli bir etkeni olarak da saptanmaktadır (25,26). Ayrıca *K. pneumoniae* kan dolaşımı ve idrar yolu enfeksiyonlarının yaygın etkenleri arasında göze çarpmaktadır (23).

2.1.3. Laboratuvar Tanısı

Kültür için alınan örnekler kanlı agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar besiyerlerine ekilir. *K.pneumoniae* bu besiyerlerinde mukoid, büyük, akıcı S

veya R tipinde koloniler oluşturmaktadır. *Klebsiella spp.*'lerin tür ayrımı Indol, Metil red, Voges proskauer, Citrat (IMVIC) testleri ve çeşitli biyokimyasal testlerle yapılabilmektedir.

Klebsiella spp.'ler üreaz ve lizin dekarboksilaz pozitiftir. Nişastayı dört günde parçalayıp gaz yapmaları ile diğer Enterobacteriaceae ailesinden ayrılırlar. *Klebsiella spp.*'ler kendi aralarında ise indol, ornitin dekarboksilaz, D-glukoz fermentasyon özellikleri incelenerek ayrılabilirler. K.pneumoniae'nın IMVIC testleri (--++)'tir (23).

Tablo 1. *Klebsiella* türleri (27)

1.Grup	2.Grup (Raoultella)	3.Grup
Klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae	***Klebsiella ornithinolytica***	***Klebsiella oxytoca (oxy-1 ve oxy-2)***
Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis	***Klebsiella planticola***	
Klebsiella pneumoniae subspecies ozaenae	***Klebsiella trevisanii***	
Klebsiella granulomatis	***Klebsiella terrigena***	

2.1.4. Antijenik Yapı Ve Virülans Faktörleri

Kapsüler Antijenler: *Klebsiella spp.* cinsi bakterilerin temel virülans faktörüdür ve bakteriyi fagositozdan korur. Kapsül polisakkaritlerinin makrofajların fonksiyonel kapasitelerini ve farklılaşmalarını engelledikleri ayrıca infekte bölgeye lökosit göçünü geciktirdikleri bilinmektedir. İnsanlardaki infeksiyonlardan *K. pneumoniae'nın* K1, K2, K3, K5 ve K21 suşları sorumludur (28). Bu antijenlerin bazıları *E.coli* K1, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* kapsül antijenleri ile benzer özellik gösterir. K antijenleri kromozomlar tarafından kodlanır (28).

Fimbria: Virülans faktörlerinden olan fimbrialar adezyondan sorumlu en önemli yüzey ligantlarındandır. Özellikle GN bakterilerde bulunmakla birlikte bazı gram pozitif bakteriler de fimbriaya sahip olabilirler (28,29).

Endotoksin*: Klebsiella spp.* cinsi bakteriler O polisakkarid antijenlerine göre 12 antijenik gruba ayrılmışlardır. Ancak çeşitli kapsül antijenlerinin aynı O serogruplarında bulunması ve teknik güçlüğü nedeni ile O serogrup belirlemenin pratikte bir önemi yoktur . Endotoksin aynı zamanda bir endojen pirojendir (29).

Sideroforlar: *Klebsiella spp*.'lerde konakdan demir iyonunu alabilen sideroforların varlığı gösterilmiştir. Sideroforlar sistemik infeksiyon için esansiyel bir faktör olarak bakterilere avantaj sağlarlar (28,29).

2.1.5. Epidemiyoloji ve Korunma

Özellikle hastane ortamında oluşan dirençli kökenler epidemiyolojik olarak önem taşımaktadır. Dirençli kökenlerin yayılımının önüne geçilmesi gerekmektedir. Bunun için hastanelerde temas önlemlerinin alınması, kolonize hasta izolasyonu, antibiyotik kullanımının kısıtlanması, el hijyenine dikkat edilmesi, çevresel yüzeylerin dekontaminasyonu ve sağlık personelinin eğitimi gibi enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalıdır (31,32).

2.1.6. Tedavi

Klebsiella pneumoniae salgıladığı beta laktamaz enzimi nedeniyle beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir. En sık GSBL üreten bakteri *K.pneumoniae*'dır ve GSBL üretimi söz konusu olduğunda penisilinler ve sefalosporinlerin kullanımı kısıtlanmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde GSBL'den etkilenmeyen karbapenem grubu antibiyotikler kullanılmaktadır (23). Fakat son zamanlarda karbapenem dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyonlarının artmasıyla birlikte yeni tedavi seçenekleri gündeme gelmiştir. Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili ajanlar kolistin, tigesiklindir. Aminoglikozidler de etkin olabilmektedir. Bu organizmalara karşı kombinasyon tedavileri de

uygulanmaktadır. Tigesiklin, karbapenemler, rifampin ve doksisiklin gibi ajanların kolistin ile kombinasyonunun çeşitli time-kill çalışmalarında karbapenemaz üreten *K.pneumoniae*'ya karşı sinerjistik etkili olduğu gösterilmiştir (33,34,35).

2.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

Ortak bir beta-laktam halkası taşıyan ve hücre duvarı sentezini inhibe ederek, antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur. 1949'da penisilinin üretiminin, kimyasının ve etki mekanizmasının kuramsal olarak incelenmesinden bu yana çok sayıda beta-laktam antibiyotik doğal veya sentetik olarak elde edilmiştir. Klasik olarak beş grupta toplanırlar:

1- Penisilinler

2- Sefalosporinler

3- Monobaktamlar

4- Karbapenemler

5- Beta-laktam + beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam)

Beta-laktam antibiyotikler bakterilerin membranlarında bulunan Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP) adlı hedef proteinlere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Penisilin bağlayıcı proteinler, bakteri hücre duvarında "peptidoglikan" adı verilen temel bir elemanın üretiminden sorumludur. Beta-laktam antibiyotik tarafından PBP'leri inhibe edilen bakteride peptidoglikan sentezlenemez ve hücre duvar yapısı bozulur. Sonuçta osmotik direnci bozulan bakteri hücresi ölür (36,37).

2.2.1. Karbapenemler

Karbapenemler *Streptomyces cattleya* tarafından sentezlenen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. Beta laktam grubu antibiyotiklerden olan karbapenemler, bugüne kadar geliştirilen en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Bu gruptaki antibiyotiklerin sınıflaması tablo 2.'de verilmektedir (9). Birinci grup karbapenemlerden olan ertapenem ve panipenem toplumdan edinilmiş ciddi infeksiyonların tedavisinde, ikinci grup karbapenemler ise güçlü nonfermantatif etkinlikleri nedeniyle hastane infeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Üçüncü grupta yer alan CS-023 ise ikinci grubun etkinliğine ek olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı da etkinlik göstermektedir (8,9).

Tablo 2. Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması (9)

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

Karbapenemler yapısal olarak diğer beta-laktamlardan farklıdır. Karbapenemler 6. pozisyondaki trans konfigürasyonda bir hidroksietil yan zincire sahiptir ve bisiklik nükleusta bir sülfür veya oksijen atomu eksiktir. Hidroksietil yan zincirinin benzersiz kimyasal yapısı beta-laktamazlara karşı dayanıklılığı sağlar (38).

PBP'lere yüksek afinite ile bağlanırlar. Beta-laktamaza karşı dayanıklıdırlar. Karbapenemazlar, karbapenemlerin kimyasal yapısını bozarlar (39).

2.2.1.1. Karbapenemlerin Duyarlılık Sınır Değerleri

CLSI'ın 2016'da ertapenem, imipenem ve meropenem için karbapenem sınır değerleri tablodaki gibidir (Tablo 2.3). Bu sınır değerleri, karbapenemaz üretimini saptamak için ek bir teste gerek duymadan karbapenem tedavisini yönlendirmede etkili bulunmuştur (40).

Tablo 3. 2016 CLSI *Enterobacteriaceae* için karbapenem sınır değerleri (40)

	Sınır değerler (CLSİ 2016)	
	MİK mg/L (S-R)	**Disk (mm) (S-R)**
Ertapenem	≤0.5 - ≥2	≥22 - ≤18
Imipenem	≤1 - ≥4	≥23 - ≤19
Meropenem	≤1 - ≥4	≥23 - ≤19
Doripenem	≤1 - ≥4	≥23 - ≤19

2.2.1.2. İmipenem

Bilinen en geniş spektrumlu beta laktam antibiyotik olan imipenem gram-pozitif, gram negatif, aerop ve anaerop mikroorganizmaları içine alan bir etki spektrumuna sahiptir. Özellikle dirençli GN etken veya polimikrobiyal infeksiyon düşünüldüğünde, kültür ve antibiyogram sonuçları beklenilmeden ampirik olarak başlanılabilir (41).

İmipenem beta-laktam halkası içermekle birlikte diğer beta-laktam antibiyotiklerden farklı olarak sis konfigürasyonundaki açil amino yan zincirinin yerine trans konfigürasyonunda hidroksietil yan zinciri içerir. Trans konformasyonu nedeniyle beta-laktamaz dayanıklılığı kazanmış olur. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak birinci pozisyondaki karbon atomu yerine sülfür bulunur. Bu nedenle karbapenemlerin bakteri hücresindeki hedef

proteinlere bağlanması artmıştır. Bu da antibiyotiğin etki spektrumunu genişletir ve antibakteriyel gücünü arttırır. Molekül ağırlığının düşük olması nedeniyle bakterinin hücre membranındaki porlardan geçişini kolaylaştırır (42).

2.2.1.3. Meropenem

Meropenem etki spektrumu olarak imipeneme benzemekle birlikte 1-beta metil grup ve 2-tiopirolidinil eki dolayısı ile DHP-I'e dayanıklı hale gelmiştir ve uygulamada silastatine gerek yoktur. Klinik olarak önemli olan aerobik ve anaerobik bakterilerin büyük çoğunluğuna karşı son derece etkilidir. Hem imipenem hem de meropenemin başlıca hedefi PBP 2 olup; meropenem, *P.aeruginosa* ve *E.coli*'nin PBP 2 ve PBP 3'üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve GN bakterilerdeki karbapenemazlar dışındaki diğer tüm beta-laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden imipenem GP organizmalara karşı daha etkili iken, meropenem GN'lere, özellikle de *P.aeruginosa*'ya daha etkilidir. İmipeneme göre direnç gelişimi daha düşük olmakla birlikte daha az yan etkisi vardır (43,44).

2.2.1.4. Ertapenem

Ertapenem, 2001 yılında geliştirilmiş, 1-beta-metil karbapenemdir. Birçok GP ve GN aerobik ve anerobik bakterilere karşı etkinliği bulunan ertapenem genellikle toplum kökenli infeksiyonların tedavisinde kullanılır (45,46). Diğer karbapenemlerin sahip olduğu birçok yapısal özelliğe sahiptir ancak onu diğer karbapenemlerden ayıran en önemli özellik dış membranında benzoik asid yerine meta grubunun yer almasıdır. Bu yapının bir sonucu olarak molekülün plazma proteinlerine bağlanma kapasitesi artar. Ertapenemin proteinlere bağlanma kapasitesi %95 iken, bu oran imipenemde %20'dir. Bu yüksek protein bağlanma kapasitesi sonucunda ertapenemin serbest kısmı

azalır ve plazma yarılanma ömrü uzar. Böbreklerden atılır. Yarılanma ömrü imipenem ve meropeneme göre belirgin derecede fazladır. Uzun etkili sefalosporinlerde olduğu gibi günde tek doz (1 gr/gün) tedavi rejimi uygulama imkanı verir (47,46).

Bakterinin hedef molekülündeki değişiklikler ertapeneme karşı olan dirençte önemli rol oynar. Bu sebeple PBP'lerdeki değişiklik sonucu oluşan metisiline dirençli stafilokok türlerine etkisizdir. Ertapenem MBL ve bazı diğer karbapenemazlar hariç GSBL ve ampC tipi beta-laktamaz üretenler de dahil olmak üzere beta-laktamaz üreten GN bakterilere etkili bulunmuştur. Non-fermentatiflerde içsel direnç nedeniyle tercih edilmezler (49,50,51,52,53).

2.2.1.5. Doripenem

Doripenem (S-4661) de bir 1-beta-metil karbapenemdir. Doripenem, birçok dirençli patojene karşı en etkin antibiyotik sınıfı olan karbapenemlerin yeni bir üyesidir. Etkinlik spektrumu bakımından meropenem ve imipeneme benzerdir (48). Diğer beta-laktam antibiyotikler gibi PBP'lere bağlanarak bakterinin hücre duvarı sentezini inhibe eder (54,55).

Doripenem, duyarlı patojenlerin neden olduğu komplike üriner sistem infeksiyonları, komplike intraabdominal infeksiyonlar, hastane kökenli pnömoni ve ventilatörle ilişkili pnömoni tedavisinde kullanılabilir (48).

2.3. ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Bir bakterinin antimikrobiyal ajanın öldürücü veya üremeyi engelliyici etkisine karşı koyabilme yeteneğine direnç denir. İlk kez *Escherichia coli* suşunda penisilini parçalayan bir enzim varlığını gösteren Abraham ve Chain tarafından 1940 yılında bildirilmiştir. 1944 yılında Kirby, *Staphylococcus aureus* suşlarında benzer özelliklerde bir başka enzim elde etmiştir. Penisilin

yaygın olarak kullanılmaya başlamadan önce hem Gram negatif hem de Gram pozitif mikroorganizmalarda penisiline karşı direnç saptanmıştır. 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı bazı adalarda, toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakteriler bulunduğu tespit edilmiştir. Bütün bunlar antibiyotik direncinin sadece yaygın antibiyotik kullanımının bir sonucu değil, bakterinin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğunu göstermektedir. Bunları izleyen yıllarda antibiyotik kullanımının etkileri görülmeye başlanmıştır. 1959 yılında Japonya'da *Shigella dysenteriae* suşlarında çoklu antibiyotik direnci saptanmış ve direnç özelliği konjugasyon ile *Escherichia coli* suşlarına aktarılabilmiştir. 1960-1970'li yıllar arasında önce *Staphylococcus aureus* sonra da hastane salgınlarından izole edilen Gram negatif basil türlerinde ilaç direnci saptanmıştır. Direnç sorunundaki artışa paralel olarak ilaç endüstrisi de gelişmiştir. Sefalosporinler (1980) ve florokinolonlar (1990) geliştirilmiş ve enfeksiyon kontrolünde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (56,57).

Antibiyotiklerin gelişigüzel kullanılması, yoğun bakım servislerinde yatan ve immun sistemi baskılanmış hasta sayısının artması, gıda endüstrisinde antibiyotik kullanımı gibi sebeblerle mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci artmaktadır. Antibiyotik kullanımının daha yoğun olması nedeni ile hastanelerde direnç daha sık gözlenmektedir. Ülkemizdeki hastanelerde dirençli bulunan mikroorganizmalar sıklıkla; *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp., Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Staphylococcus aureus* ve enterokoklardır (56,57).

Çeşitli nedenlerle bakteriler antibiyotiklere dirençli bulunabilir;

İntrinsik Direnç (Doğal Direnç) (içsel direnç): Bakterilerin genetik ve morfolojik yapısı nedeniyle bazı antibiyotiklere doğal direnci vardır. Örneğin vankomisin, büyük moleküllü olmasından dolayı GN'lerde dış membrandan geçememekte ve peptidoglikan tabakaya ulaşamamaktadır. Sonuç olarak GN bakterilerde bu antibiyotiğe karşı içsel direnç vardır (58).

Çevre ve Koşullara Bağlı Direnç: Antibiyotiklerin pH farklılıkları, enfeksiyon bölgesine zor ulaşması, oksijen farklılıkları gibi nedenlerle etkilerinin in vitro ve in vivo olarak farklılık göstermesine sebep olan dirençtir. Bundan dolayı in vitro testlerde, etkili bulunan bazı antibiyotikler in vivo koşullarda etki göstermeyebilir (58,59,60).

Kazanılmış Direnç: Bir bakteri genetik özelliklerindeki değişimlere bağlı önceden duyarlı olduğu bir antibakteriyel ajana karşı direnç kazanabilir. Genetik kaynaklı direnç, kromozomal veya kromozom dışı elemanlara bağlı olabilir. Antibiyotik kullanımı sırasında kromozomal mutasyonların oluşması dirençli patojenlerin gelişebilmesinde veya direnç genlerinin aktarılmasında önemlidir (58,59,60).

2.4. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇ MEKANİZMALARI

Beta-laktam antibiyotiklerin etkin olabilmesi için, PBP'lere yeterli düzeyde bağlanması gereklidir. Bakteriler PBP'lere bağlanma sürecinde, basamakların her birinde bir engel oluşturarak direnç geliştirebilirler. Bakterilerde beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 4 farklı mekanizma ile gelişebilmektedir.

İlacın hedef bölgesindeki değişiklikler: PBP'lerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sonucu PBP'nin afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi ile oluşabilmektedir (61,62,63).

Dış membran geçirgenliğinin bozulması: Beta-laktam antibiyotikler GN bakterilerin membranındaki "outer membrane protein" (OMP) adı verilen porlar yolu ile hücre içine girebilmektedir. Başlıca porin F ve porin C adı verilen 2 kanal kullanırlar. İmipenem ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanır. Bu nedenle GN bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak değiştirdiği takdirde tüm beta-laktamlara direnç gösterebilirken, imipeneme duyarlı kalabilir. Öte yandan, özellikle *P.aeruginosa* ve

Enterobacter suşlarında dış membrandan D2 porin proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir (63,64).

Beta-laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi: Beta-laktamazlar, penisilinler, sefalosporinler ve buna benzer beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edip etkisiz hale getirirler. Bu beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile bir ester köprüsü kurup siklik amid bağını parçalayarak bir açil-enzim türevi oluştururlar. Daha sonra enzim açil molekülü birbirinden ayrılır. Bakterilerde bulunan beta-laktamaz enzimi indüklenebilir veya yapısal nitelikte olabilir. Beta-laktamaz genleri bakteri plazmidi, kromozomu, transpozon veya integron gibi genetik elemanlar üzerinde bulunabilir (64).

Efluks pompası: Direnç konusunda en aktif araştırma alanları arasında, bakteri hücresi içindeki bir veya birden çok antibiyotik grubunu dışarı atan pompalar yer almaktadır. Aktif efluks pompaları oldukça seçici olabilir veya geniş bir substrat özgüllüğü gösterebilir. Bu pompalar genellikle sitoplazmik membranda bulunmaktadır. Bazı durumlarda değişik tipteki pompaların bir araya gelmesi etkinin artmasına, dolayısıyla tek bir pompa ile oluşandan daha yüksek düzeyde dirence yol açabilmektedir (65,66,67,68).

2.5. BETA-LAKTAMAZLAR

Abraham ve Chain tarafından 1940'lı senelerde penisilinazlar tanımlanmıştır. Günümüze kadar 800'den fazla beta-laktamaz enzimi keşfedilmiştir. Beta-laktamazların bu kadar fazla ve çeşitli olması bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. Richmand ve Sykes tarafından beta-laktamazlar 1973 yılında sınıflandırılmış, bu sınıflandırma 1976 yılında Sykes ve Matthew tarafından geliştirilmiştir (21)

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırılmaları kullanılmaktadır. Beta-laktamazlar 1980 yılında Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır (71).

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin amino asiti taşırlar. Penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.

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

Sınıf C: Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılırlar. Öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

Sınıf D: Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Bush ve arkadaşları beta-laktamazları 1989 yılında fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırmışlardır. Fonksiyonel sınıflandırmada kullanılan bazı kriterler, antimikrobiyal substrat profil spektrumu, enzimin net yükü, enzim inhibisyon profili, hidroliz oranı (Vmax), izoelektrik noktası, bağlanma afinitesi (Km), protein moleküler ağırlığı ve aminoasit kompozisyonu olmuştur. Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasında 4 ana grup ve bunların alt grupları bulunmaktadır. Bush ve arkadaşları 1995 yılında bu sınıflama üzerinde yapmış oldukları uyarlamalar ile tabloya son şeklini vermişlerdir. Beta-laktamazların özellikleri, aminoasit değişiklikleri ve yeni katılan enzimlerin tanıtılması gibi güncel bilgiler www.lahey.org/studies web adresinden bildirilmektedir (3,72).

Yeni sınıflandırma şeması tablo 4'te ana hatları ile görülmektedir (73). Bu sınıflandırma klinik mikrobiyoloji laboratuvarında antibiyogram değerlendirmede avantaj sağlarken, tek bir nokta mutasyonu ile substrat özgüllüğünün değişebilmesi ise dezavantajıdır. Beta-laktamazların nükleotid dizilenmesini temel alan Ambler sınıflaması ise mutasyonlardan etkilenmemektedir (69,70,74).

Tablo 4. Beta-laktamazların sınıflandırılma şeması (8)

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

2.6. KARBAPENEMAZLAR

Karbapenemazlar beta-laktam grubundaki karbapenemlerden birini belirgin şekilde hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Karbapenemazlar sadece karbapenemlere değil, diğer beta-laktam grubundaki antimikrobiyallere de etkilidirler. Ancak bu enzimlerin afinitesi karbapenem grubu beta-laktamlara, diğer beta laktamlardan daha fazladır (75).

Karbapenemaz kaynaklı direnç intrinsik ya da kazanılmış (ekstrinsik) olabilir (19). *Stenotrophomonas maltophilia, Aeromonas spp., Flavobacterium spp., Bacteroides fragilis* gibi bazı bakterilerde görülen intrinsik direnç, kromozom kontrolünde olması nedeniyle yayılmamıştır. Fakat son yıllarda karbapenemazların plazmid kontrolünde ortaya çıkması bu durumu değiştirmiştir. Özellikle *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp*.'de ve daha nadir olmak üzere *Klebsiella spp*. Ve *Serratia marcescens*'de bildirilmiş olan bu plazmid kaynaklı enzimler, son yıllarda çeşitli ülkelerde artan sıklıkta bildirilmektedir (76,77). Kazanılmış karbapenemazlar karbapenemlerin yanında, diğer beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirence sebep olmaktadır. Karbapenemazlar Ambler sınıf A, B ve D beta-laktamaz üyesidirler (75). Sınıf A karbapenemazları SME, NMC, IMI, KPC ve GES gibi enzimleri oluştururken; sınıf B karbapenemazları IPM, VIM, GIM, SPM, SIM ve NDM-1 gibi enzimler, sınıf D karbapenemazları ise oksasilinleri hidroliz eden OXA enzimleri örnek verilebilir (16). Tablo 5.'te karbapenemaz enzimlerinden bazılarının moleküler sınıf ve fonksiyonel gruplarına göre substrat, hidroliz ve inhibisyon profilleri görülmektedir (78,79,80,81).

Tablo 5. Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri (16)

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

[a]sembolleri: **+**;kuvvetli hidroliz, **±**;zayıf hidroliz, **-**;hidroliz yok

[b]sembolleri: **+**;inhibisyon mevcut, **±**;değişken inhibisyon, **-**;inhibisyon yok

2.6.1. Sınıf A (Fonksiyonel 2f) Karbapenemazlar

Kromozomla kodlanan NMC, SME ve IMI enzimleri, plazmidle kodlanan KPC ve GES enzimleri sınıf A'nın büyük bir bölümünü oluşturmaktadır. Bunların hidrolitik mekanizmaları aktif bölgesinde bir serin aminoasidine gereksinim gösterir (82).

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

Diğer beta-laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde serin yerine çinko iyonu bulunan enzimlerdir. Beta-laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi) etkilenmezler ama etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) ile inaktive olurlar. Bu enzimlerin en önemli özelliği genellikle monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta-laktamları hidroliz ederler. MBL enzimi 1960 yılında *Bacillus cereus*'ta, 1980'li yılların başında *Stenotrophomonas maltophilia*'da gösterilmiştir. Daha sonra *Bacillus fragilis* ve *Aeromonas hydrophilia'* da imipenemi hidrolize eden MBL enzimi bildirilmiştir. Kromozomal ve aktarılabilir MBL'lar olarak iki gruba ayrılır. Kromozomal MBL enzimlerinin en önemli özelliği indüklenebilir olmalarıdır. Aktarılabilir MBL'lara örnek IMP, VIM, SPM-1, GIM-1, SIM, NDM-1'dir. Bütün MBL'lar imipenemi hidrolize ederler. Ancak bu özellikleri oldukça değişken olup, hidroliz etme hızı bakterinin karbapenemlere direncinin seviyesi ile uyumlu olmayabilir. Bu enzimler imipenem ve diğer beta-laktamları hidrolize etme temeline göre alt gruplara (alt grup 3a, 3b, 3c) ayrılmıştır (16,75,84,85,86,87,88,89,90).

2.6.3. Sınıf D Serin Karbapenemazlar; OXA Beta-laktamazlar

Ambler grup D ve fonksiyonel grup 2d'de yer alan ve Enterobacteriaceae, Acinetobacter ve P.aeruginosa 'da bulunan GSBL'lerdir. "Oxacillin-hydroliyzing" beta-laktamazlar (OXA) klavulanik asit ve EDTA ile iyi inhibe edilemezler ve aminoasit dizilerinde çok fazla değişkenlik gösterir (16). Oksasilinazların çoğu plazmid veya integronlardaki genlerde kodlanmıştır. Bu durum direncin kolayca yayılmasına ve bu enzimleri üretebilen izolatların prevalansının artmasına neden olmaktadır (92,93).

Etki ettikleri substrat spektrumu geniştir. Penisilinleri (benzil penisilin, ampisilin, piperasilin, tikarsilin) ve dar spektrumlu sefalosporinleri (sefalotin ve sefaloridin) etkin şekilde hidrolize ederken, geniş spektrumlu beta-laktamları

(seftazidim, sefotaksim ve aztreonam) çok az hidrolize eder ya da hiç hidrolize etmezler (81).

Çeşitli klinik örneklerden izole edilebilen oksasilinazlar plazmidlerde kodlanırlar. OXA tipi karbapenemazlardan ise *A.baumannii*'deki OXA-23, OXA-40, OXA-58 geni ve *Klebsiella pneumoniae*'daki OXA-48 geni plazmid üzerinde yer almakla birlikte, bu genlerden hiçbiri gen kasetinin içerisinde değildir. Buna karşın bu OXA tipi karbapenemaz genleri insersion sekansları (IS) ile ilişkili bulunmuştur (81,94).

En son sayımda aminoasit homolojileri göz önünde bulundurularak 9 majör OXA karbapenemaz alt grubu belirlenmiştir (19,81,96).

2.6.3.1. OXA-48 Beta-laktamazı

Shewanella oneidensis'in OXA-48'in doğadaki rezervuarı olduğu gösterilmiştir. Bu bakterinin su kaynaklı bir GN bakteri olduğu bilinmektedir. Kromozom tarafından kodlanan oksasilinaz, ilk defa *Enterobacteriaceae* ailesinden *Proteus mirabilis*'te OXA-23 geninin bulunmasıyla ortaya konmuştur. Daha sonra da ilk defa Türkiye'de bir *K.pneumoniae* izolatında OXA-48 geni bulunmuştur (95). Bu *Klebsiella* suşu İstanbul Üniversitesi Hastanesinde yatmakta olan 54 yaşındaki bir hastanın idrar kültüründen 2001 yılında izole edilmiştir. Bu suşun test edilen bütün beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler, kloramfenikol, nalidiksik asit, rifampin ve sülfonamidlere dirençli olduğu saptanmıştır (19).

Beta laktamaz üreten OXA-48 geni plazmidle kodlanmakta olup, IS1999'un yanında bulunur. Bu da insersion sekansının (IS), bu beta-laktamaz geninin transfer işleminde bir role sahip olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca bu IS elemanı ile oksasilinaz geni arasındaki ilişkiyi gösteren ilk rapordur. Diğer karbapenemleri hidrolize eden oksasilinaz genleri gibi OXA-48 geni de klas 1 integronunda bir gen kasedinin içinde yer almaz (19).

OXA-48 beta-laktamazın biyokimyasal özellikleri: OXA-48 beta-laktamazın hidroliz profilinin dar olduğu, bu profilin penisilinler, sefalotin,

imipenem ve daha düşük bir oranda da sefotaksim, seftazidim, sefepim ve sefpiromu içerdiği gösterilmiştir. OXA-48'in katalitik aktivitesinin imipenem için OXA-40'tan 10 kat, KPC-1'den üç kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir (19,91). Meropenem hidrolizinin ise diğer OXA (OXA-24, OXA-26 gibi) beta-laktamazlara benzer bir seviyede olduğu raporlanmıştır (19).

OXA-48'in klavulonik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile inhibisyonu zayıftır. Bununla beraber diğer oksasilinazlarda sık görülen bir özellik olarak OXA-48'in de NaCl ile inhibisyon gösterdiği gözlemlenmiştir (94).

OXA-48 beta-laktamazının, karbapenemleri diğer oksasilinazlardan çok daha fazla hidrolize ettiği saptanmıştır (19,96). *Klebsiella pneumoniae'nın* OXA-48 beta-laktamazı sentezleyen suşları karbapenemlere yüksek düzeyde dirençlidir (97,83).

2.7. KARBAPENEMAZ AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

2.7.1. Karbapenemazların Moleküler Olmayan Yöntemler İle Saptanması

Karbapenemaz üreten bakterilerin tespiti, uygun antimikrobiyal tedavi seçimi ve enfeksiyon kontrol önlemleri için önemlidir (98). Karbapenemaz aktivitesini tespit etmek için bir çok moleküler olmayan test önerilmiştir (99). Bunlardan bazılar yüksek spesifikliğe ve duyarlılığa sahiptir (100).

Ertapenem karbapenemazların saptanmasında imipenem ve meropeneme göre daha duyarlı olmasına karşın daha düşük özgüllüğe sahiptir. AmpC ve GSBL gibi diğer beta- laktamazların üretimi ve azalmış permeabilite imipenem ve meropenemden daha çok ertapenem MİK değerlerini değiştirir. Bu nedenle karbapenemaz aktivitesinin fenotipik olarak belirlenmesinde tarama amacıyla ertapenem kullanılması önerilmektedir (98).

Karbapeneme dirençli suşların tespitinde sıvı mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon, E-test ve otomatize yöntemlerden çok daha yüksek duyarlılık göstermektedir (98).

2.7.1.1. Modifiye Hodge Testi

Karbapenemaz aktivitesini gösteren, uygulanması kolay fenotipik yöntemlerden birisi modifiye Hodge testi (MHT)'dir. Bu test karbapenemlere duyarlı E.coli suşunun, karbapenemaz üreten bir bakteriyle birlikte bulunduğunda inhibisyon zonunun daralmasıyla karakterizedir (101). Modifiye Hodge testi, E.coli ATCC 25922 standart suşu bir karbapenem diski kullanılarak karbapenemaz varlığının tespiti için kullanılmaktadır (102).

Test için 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan E. coli ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Mueller Hinton buyyonda sulandırıldıktan sonra Mueller Hinton Agar (MHA) plağına ekilir. Ertapenem veya meropenem disklerinden biri plak merkezine yerleştirilir. Bir öze veya eküvyon ile 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterisi alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20-25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilir ve plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilir. Bu plakta, test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışına bakılır. Üremede artış görülmesi ile karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilir (98).

2.7.1.2. Disk Yöntemleri

Karbapenemazlara özgün inhibitörlerin ilavesiyle karbapenemaz aktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi tanıda yardımcı bir diğer yöntemdir. Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit, sınıf B MBL'lar için EDTA ya da dipikolinik asidin karbapenemaz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (98).

Boronik asit fenotipik testinin KPC pozitif suşların belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber hazır formu olmaması ve sonuçların açıklanması için bir güne daha ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır (103).

Yapılan çalışmalarda karbapenemaz aktivitesini belirlemek için EDTA ve boronik asidin çeşitli konsantrasyonlarındaki etkinliği değerlendirilmiştir. Uygun çözücüde belirli konsantrasyonda hazırlanan inhibitör madde,

karbapenem disklerine emdirilerek kombine diskler hazırlanır. Test için 0.5 McFarland'a eşit konsantrasyonda test edilecek bakteri süspansiyonundan MHA plağına ekilir. Kombine diskler ile sadece karbapenem içeren diskler uygun aralıkta plak yüzeyine konulur. 16-18 saatlik inkübasyondan sonra kombine olan karbapenem diski ile kombine olmayan disk inhibisyon zon çapları karşılaştırılır. İnhibisyon zon çaplarında 5 mm ve daha fazla artış olması karbapenemaz üretimi açısından anlamlı kabul edilir (98).

Temosilin Enterobacteriaceae'ye etkili, penisilinaz, GSBL ve AmpC tipi enzimler tarafından hidrolize edilmeyen, dar spektrumlu bir penisilindir. KPC tip karbapenemaza karşı in vitro koşullarda etkili olabilmekte ancak OXA ve MBL tipi karbapenemazlara karşı etkin değildir (104,105,106).

OXA-48 tipi karbapenemazların tespiti için kullanılan bir inhibitör bulunmamakla birlikte EDTA ve boronik asit gibi inibitörlerle inhibasyon saptanmadığı durumlarda OXA-48 araştırılması için temosilin disk difüzyon veya temosilin MIK yöntemi kullanılabilir. Yüksek düzey temosilin direnci (MİK>32 mg/L veya temosilin diski (30µg) ile <10 mm zon, OXA-48 için fenotipik belirleyicidir (107,108).

2.7.1.3. Enzim Ekstraksiyonu Uygulaması

Karbapenemaz aktivitesini belirlemede bir diğer fenotipik yöntem enzim ekstraksiyonu uygulamasıdır. Bakteriden sonikasyon yöntemiyle elde edilen enzim karbapenem diski üzerine eklenerek enzim içeren kombine diskler oluşturulur. 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan E.coli ATCC 25922 süspansiyonları hazırlanan MHA agar plağına sürülerek, üzerine enzim içeren kombine karbapenem diski ve kombine olmayan karbapenem diski yerleştirilir. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra enzim içeren diskin inhibisyon zon çapında, içermeyen diskin inhibisyon zon çapına göre 2 mm ve daha fazla azalma olması karbapenemaz üretimi açısından anlamlı kabul edilir (103).

2.7.1.4. Spektrofotometre

Karbapenemaz aktivitesi, UV spektrofotometre kullanılarak yapılabilir. Birkaç basamaktan oluşmaktadır. Birinci basamak 18 saat kültür inkübasyonu, ikinci basamak protein ekstraksiyon aşaması ve son aşama ise bir UV spektrofotometre kullanılarak imipenem hidrolizinin ölçülmesidir (109).

Herhangi bir karbapenemaz aktivitesinin tespitinde bu spektrofotometre tabanlı teknik % 100 duyarlılığa ve % 98.5 özgüllüğe sahiptir (109).

Son zamanlarda, bir karbapenem molekülünün degradasyon analizine bağlı olarak karbapenemaz aktivitesinin tespitinde, Matriks İle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry) (MALDI-TOF) ekipmanının kullanımı önerilmektedir (100).

2.7.1.5. Selektif Besiyerleri

Karbapeneme karşı dirençli organizmalar için farklı selektif besiyerleri vardır. CHROMagar KPC, bir karbapenem'i (genellikle meropenem) içerir ve yalnızca karbapenemlere yüksek düzeyde dirençli olan bakterileri tespit eder. Ama MBL veya OXA-48 üreticilerinde gözlendiği gibi düşük seviyede karbapenem direnci gösteren karbapenemazı tespit edemez. Brilliance kromojenik karbapenemaz rezistans Enterobacteriaceae agar (CRE besiyeri) bir karbapenem içermektedir ve KPC, MBL üreticilerini ve OXA-48 üreticilerinin büyük bir kısmını tespit eder. Son zamanlarda geliştirilen Supercarba besiyeri kloksasin, çinko ve ertapenem içermektedir. Herhangi bir karbapenemaz kaynaklı direncin tespitinde duyarlılığı ve özgüllüğü çok yüksektir (100).

ChromID CARBA (bioMerieux), özellikle karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae tespiti amacı ile dizayn edilmiştir. Bu besiyeri CPE'nin, özellikle de kronik taşıyıcılar veya risk altındaki hastalarda KPC ve NDM-1'in taranmasında kullanılan seçici bir kromojenik ortamdır (111).

ChromID OXA-48 agar (bioMerieux), özellikle OXA-48 tipi karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae (CPE) tespiti amacı ile dizayn

edilen, GP ve diğer karbapenemaz üreticilerin gelişimini engelleyen spesifik ajanlarla desteklenen kromojenik besiyeridir (111,112).

2.7.1.6 Biyokimyasal Yöntemler

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae'nin doğru bir şekilde tespit edilmesinde en önemli ve son gelişme Carpa NP testidir. Bu biyokimyasal testin prensibine göre imipenemin hidrolizi ile indikatörün pH değerindeki değişim (kırmızıdan sarıya/turuncuya) tespit edilir. Bu test yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahiptir (110).

2.7.1.7.İmmünokromatografik Testler

İmmünolojik reaksiyon temelli bu yöntemde, kromatografik nitroselülöz membrana sabitlenmiş antikorla, örnekte bulunan antijenin birleşmesi sonucu oluşan immün kompleks, nitroselülöz membranda renk değişimi oluşturmakta ve böylece antijen tespiti yapılabilmektedir. Bu yöntem, karbapenemaz enzimlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar sayesinde karbapenemaz saptanması gibi direnç mekanizmalarının test edilmesinde de kullanım alanı bulmuştur.

Özgül immünolojik reaksiyon temelli olan bu yöntemde, belli bir enzimi yüksek özgüllük ve duyarlılıkta tespit edebilmek mümkündür. Bazı karbapenemaz tiplerinin endemik olduğu bölgelerde o enzime yönelik immünokromatografik testlerin kullanılması verimli olabilmektedir (113,114).

2.7.2. Karbapenemazların Moleküler Yöntemlerle Saptanması

Karbapenem direncinden şüphe edildiğinde çeşitli fenotipik yöntemler önerilmekle birlikte bu direncin karbapenemaz aracılı olup olmadığı her zaman ayırt edilemeyebilir. Diğer direnç mekanizmalarıyla da karbapenem MİK değerleri yükselebilir. Bu nedenle sadece fenotipik yöntemlerle karbapenemaz aktivitesi belirlenmeye çalışıldığında yalancı pozitif sonuçlar elde edilebilir (98).

Karbapenemazların tespit edilmesinde genotipik yöntemlerin duyarlılığı fenotipik yöntemlere göre daha yüksektir. Bakterinin karbapenemaz geni DNA probları kullanılarak veya PCR yöntemi ile saptanabilir (115). Moleküler yöntemlerin altın standardı ise dizi analizi ve klonlama yöntemleridir (116,117).

Moleküler teknikler karbapenemaz genlerinin kesin olarak tespit edilmesinde **altın standart** olmayı sürdürmektedir (99). Bu tekniklerin büyük bir kısmı PCR tabanlıdır ve karbapenemaz geninin kesin identifikasyonu için bunu sekans aşamaları takip edebilir (örneğin; VIM, KPC, NDM veya OXA-48). Bunlar ya tek ya da multiplex PCR teknikleridir. Koloniler üzerine direkt olarak uygulanan bir PCR tekniğinde mükemmel duyarlılık ve spesifikliğe sahip sonuçlar 4-6 saat içerisinde elde edilebilir. Benzer şekilde, diğer moleküler teknikler de bu amaç için uygundur (127). Moleküler tabanlı teknolojilerin temel dezavantajları fiyatları, eğitimli personele ihtiyaç duyulması ve yeni genlerin tespit edilmesinde yetersiz olmasıdır. Genlerin sıralaması çoğunlukla araştırma ve epidemiyolojik amaçlarla ilgilidir (128).

Moleküler tanı yöntemlerinde etkenin nükleik asitlerini saptamak amacıyla nükleik asit hibridizasyonu kullanılmaktadır (128).

3. MATERYAL-METOD

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen karbapeneme dirençli 45 *Klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae* suşu çalışmaya alınmıştır. Klasik idantifikasyon yöntemleri ve Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) ile tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Tanıda altın standart kabul edilen moleküler yöntemlerden Real time PCR ile OXA-48 kaynaklı karbapenem direnç geni varlığı araştırıldıktan sonra 1 ml %16 gliserol içeren buyyon içerisinde süspanse edilerek -20^{o}C'de muhafaza edilmiştir. Tüm suşlardan subkültürler alınarak taze kolonilerden temosilin disk difüzyon, immunokromotografik K-SET ve ChromID OXA-48 agar testleri çalışılmıştır. Aynı hasta için sadece bir suş çalışmaya dahil edilmiştir.

3.1. KONVANSİYONEL YÖNTEMLER İLE İDANTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK ÇALIŞMALARI

3.1.1.İzolatların Eldesi

3.1.1.1. Kan Kültürü

Çeşitli kliniklerden gönderilen kan kültürü şişeleri, BacT/ALERT 3D otomatize kan kültürü cihazına (bioMerieux, Fransa) konulup pozitif uyarı alınana kadar yedi günlük inkübasyona bırakılmıştır. Pozitif sinyal veren kan kültürleri Gram boyama yapılıp, %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekilmiş ve 35-37°C'de, 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

3.1.1.2. Diğer Örnekler

Balgam, trakeal aspirat, yara, idrar örneklerinden hem yayma preparat hazırlanmış hem de %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar ve çikolatamsı agar besiyerlerine ekilmiştir. İdrar örnekleri %5 koyun kanlı agara ve CHROMagar™ Orientation besiyerine ekilerek inkübasyona bırakılmıştır. Diğer örnekler ise %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar ve çikolatamsı agar besiyerine ekilmiş ve 35-37°C'de, 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonrası üremesi olan besiyerindeki kolonilerden Gram boyama yapılmıştır. Gram negatif olarak gözlemlenenler identifikasyon için üç şekerli (TSİ), sitrat, üre, hareket, indol ve metil kırmızısı besiyerine ekilmiştir. TSİ'de asit ve gaz oluşturanlar, sitrat (+), üre (+), hareket (-), indol (-), metil kırmızısı (-) olanlar *Klebsiella spp*. olarak değerlendirilmiştir. Bu suşların antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerileri göz önüne alınarak disk difüzyon yöntemi ile çalışılmıştır.

Disk Diffüzyon Testi Yapılışı;

Besiyeri kültüründen 18-24 saat inkübe edilmiş, tek düşmüş kolonilerden 2-3 koloni alınmış ve % 3'lük triptik soy broth'lu buyyon kültürüne aktarılmıştır. Buyyon kültürü, 0,5 Mc Farland bulanıklığına ayarlanmıştır. Bulanıklığın otomatik ölçüm cihazı (DensiCHEKplus, Biomerieux, Fransa) ile 0,5 Mc Farland standardına ulaşmasından sonraki ilk 15 dakika içerisinde süspansiyon içine eküvyon batırılıp tüpün kenarında eküvyonun sıkılması ile fazla sıvı bırakılmıştır. Eküvyon, Mueller-Hinton agarın (Oxoid) tüm yüzeyine sürülerek inokulum yayılmıştır. Nemin absorbe olması için üç ile beş dakika beklenmiştir. Daha sonra diskler (Oxoid) CLSI kurallarına uygun olarak yerleştirilmiş, nemin absorbe olması için 3-5 dakika beklenmiş, sonra plaklar ters çevrilerek 37 ºC'lik etüve kaldırılmıştır. Bir gecelik inkübasyondan sonra plaklardaki inhibisyon zon çapları cetvel ile ölçülmüştür. Zon çapı ölçülürken hiçbir üremenin görülmediği kısım çapın kenarı olarak alınmıştır. Sonuçlar, CLSI'ın önerdiği yorumlama kriterlerine göre değerlendirilmiştir (Tablo 3.1).

3.1.2. Otomatize Sistem İle Tanımlama Ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bakterilerin idantifikasyonu ve antibiyotik duyarlılık testleri için Vitek-2 otomatize sistemi (BioMérieux, Fransa) tercih edilmiştir. Disk difüzyon yöntemi ile karbapenemlerden en az birine dirençli ya da azalmış duyarlı olarak bulunan suşlar Vitek-2 otomatize sistem ile çalışılmaya dahil edilmiştir. Üretici firma talimatları doğrultusunda Gram negatif bakteri idantifikasyonu için GN kartları ve antibiyotik duyarlılıklarının tayini için AST-261 kartları kullanılmıştır.

3.2. GENOTİPİK TESTLER

Moleküler çalışmalar için toplanan suşlarda karbapenemaz üretimine sebep olan genlerin araştırılmasında RT PCR (Rotor-Gene 6000, Corbett Life Sience, Avustralya) yöntemi kullanılmıştır.

3.2.1. Real Time PCR

Disk difüzyon ve Vitek-2 otomatize sistem ile dirençli bulunan suşlar altın standart olarak kabul edilen moleküler yöntemlerden Real time PCR yöntemi ile direncin OXA-48 geni kaynaklı olup olmadığı daha önceden araştırılmıştır. Real time PCR yöntemi Qiagen Artus RG PCR kit (Qiagen, Hamburg, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon döngüleri, Rotor-Gene 6000 cihazında (Corbett Research, Avustralya) belirlenmiştir. Analizler, firmanın önerileri doğrultusunda Rotor Gene software ile gerçekleştirilmiştir.

3.3 MOLEKÜLER DIŞI YÖNTEMLER İLE OXA-48 DİRENCİNİN TESPİTİ

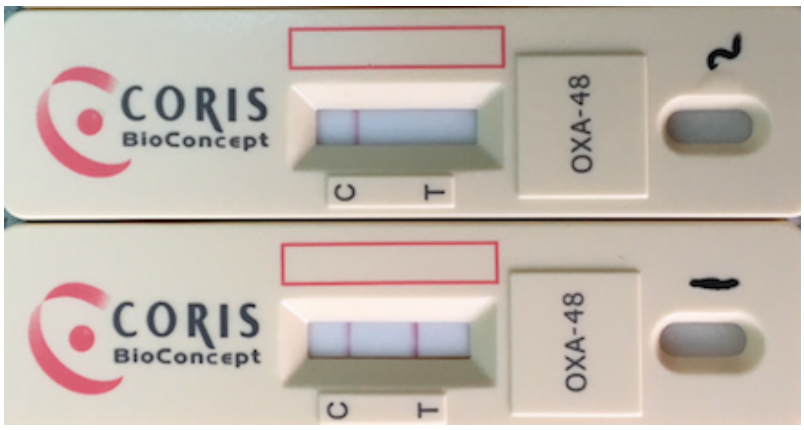
3.3.1. Temosilin Disk Difüzyon

Karbapanemaz ürettiği bilinen *Klebsiella pneumoniae* suşları 35-37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonunda üreyen kolonilerinden SF ile 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanıp eküvyon ile MHA (BioMérieux, Fransa) plağına yayılmıştır. Plaklara yüksek düzey doz içeren temosilin 30 µg (Bioanalyse, Türkiye) antibiyotik diski yerleştirilmiştir. 35-37°C'de 18-24 saatlik inkübasyon sonrasında değerlendirmeye alınmıştır. Temosilin direnci temosilin diski (30 µg) ile ≤10 mm zon OXA-48 için fenotipik belirleyici olarak değerlendirilmiştir.

3.3.2. İmmünokromatografik Test (OXA-48 K-SET Test)

OXA-48 K-SeT (Coris BioConcept, Belgium) kitleri hazır olarak temin edilmiştir. Üretici firma önerileri doğrultusunda test yapılacak her suş için bir tüp kullanılarak 10 damla test solüsyonu konulmuştur. 18-24 saatlik inkübasyon sonunda üreyen kolonilerden bir adet koloni bu tüplerdeki solüsyon ile homojenize edilmiş ve test kiti kuyucuğuna hazırlanmış olan bu solüsyondan 3 damla damlatılmıştır. Sonuçlar 15 dakika beklenildikten sonra değerlendirilmiştir. Kontrol kısmındaki tek çizgi negatif, kontrol ve test kısmındaki iki çizgi pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Resim 1. K-SET immunokromotografik yöntem (Negatif (üst, tek çizgi), pozitif (alt, çift çizgi))

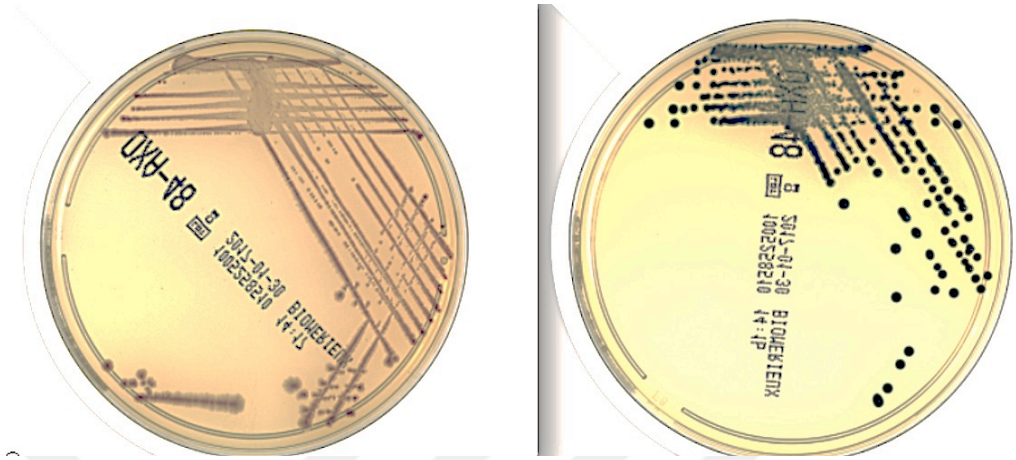


3.3.3. ChromID OXA-48

ChromID OXA-48 agar (Biomerieux, Fransa) hazır olarak temin edilmiştir. Üretici firma önerisi doğrultusunda 18-24 saatlik inkübasyon sonunda üreyen kolonilerden 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanıp 1/1000 SF ile sulandırılmıştır. Daha sonra 10 ul alınıp ChromID OXA-48 agara ekim yapılmıştır. Plaklar aerobik ortamda 35-37°C'de 18-24 saat inkübe edilmiştir.

Üretici firmanın önerisine göre pembe ve kırmızı renkli koloniler karbapenemaz pozitif *E.coli*, mavimsi- yeşilden mavimsi-gri renkli koloniler *Klebsiella spp., Enterobacter spp.,Serratia spp., Citrobacter spp.* grubu karbapenemaz pozitif bakteri olarak belirlenmiştir. Bu renklerin dışında oluşan renkler ve üreme olmaması karbapenemaz negatif olarak kabul edilmiştir.

Resim 2. ChromID OXA-48 besiyerinde üreyen E.coli (solda) ve K.pneumoniae (sağda)



3.4 İstatistiksel Analizler

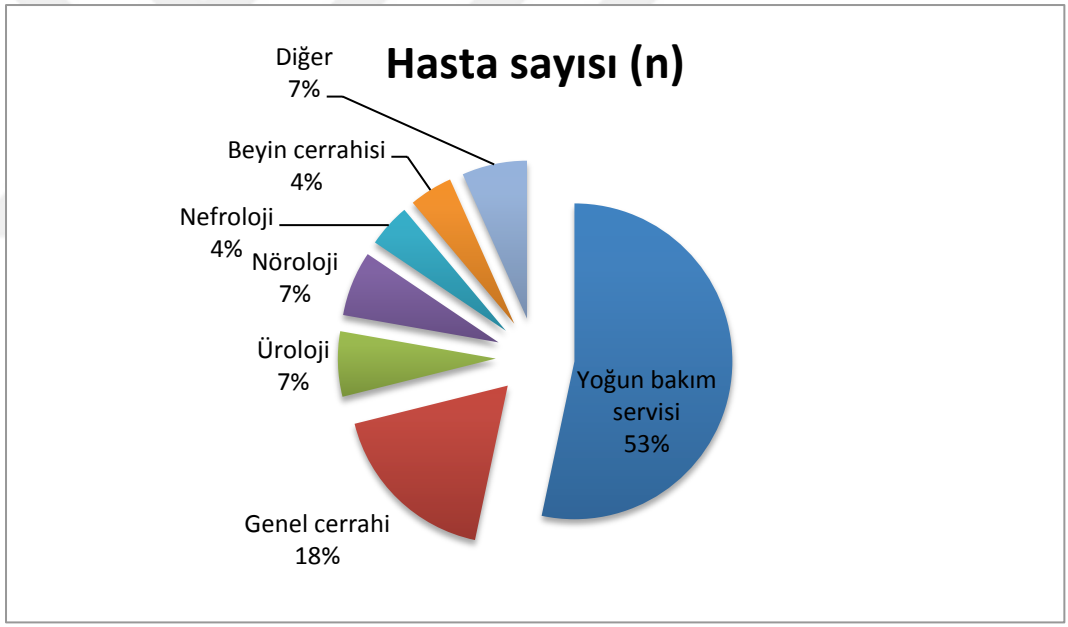
İstatistiksel Analizler IBM Statististics 20.0 (SPSS) ile yapılmıştır. Test sonuçları duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer, negatif prediktif değer, toplam doğruluk oranı, ROC Curve analizi ile değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 45 *Klebsiella pneumoniae* (KDKP) izolatı çalışmaya dahil edilmiştir.

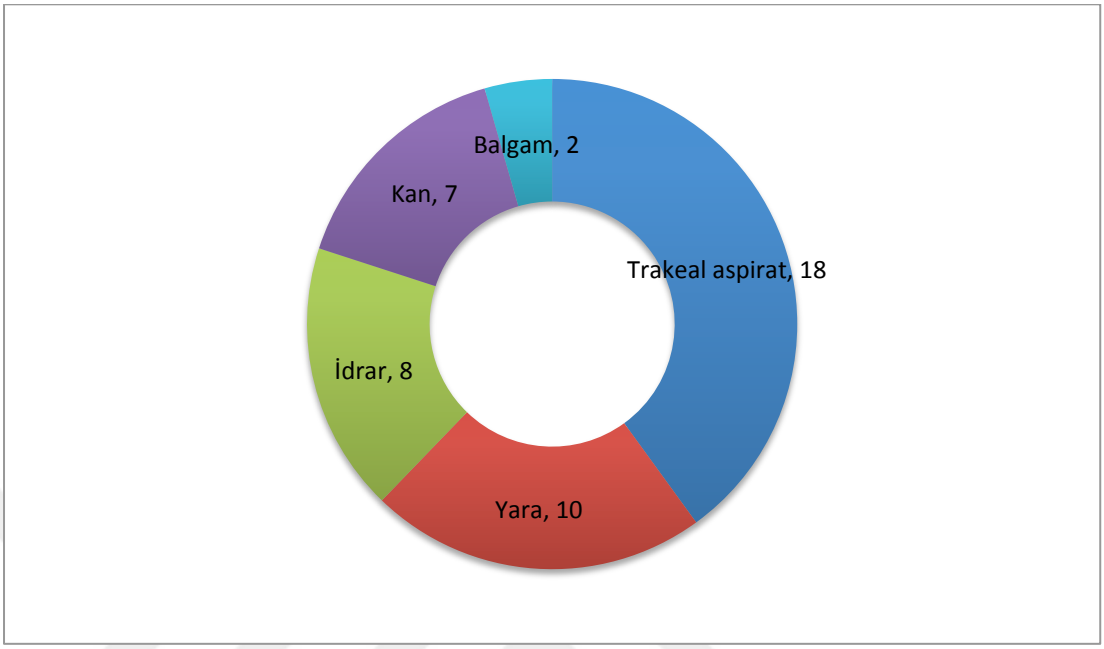
Gönderilen örneklerin kliniklere göre dağılımında 45 örneğin, %53.4'ü Yoğun Bakım Ünitesinden elde edilmiştir. Bunu sırasıyla Genel Cerrahi %17.7, Üroloji ve Nöroloji kliniği izlemektedir. İzolatların kliniklere göre dağılımı şekil 1'de görülmektedir.

Şekil 1. İzolatların kliniklere göre dağılımı



Örneklerin büyük çoğunluğu trakeal aspirat olup bunu yara, idrar ve kan örnekleri takip etmiştir (şekil 2).

Şekil 2. İzolatların materyal türüne göre dağılımı

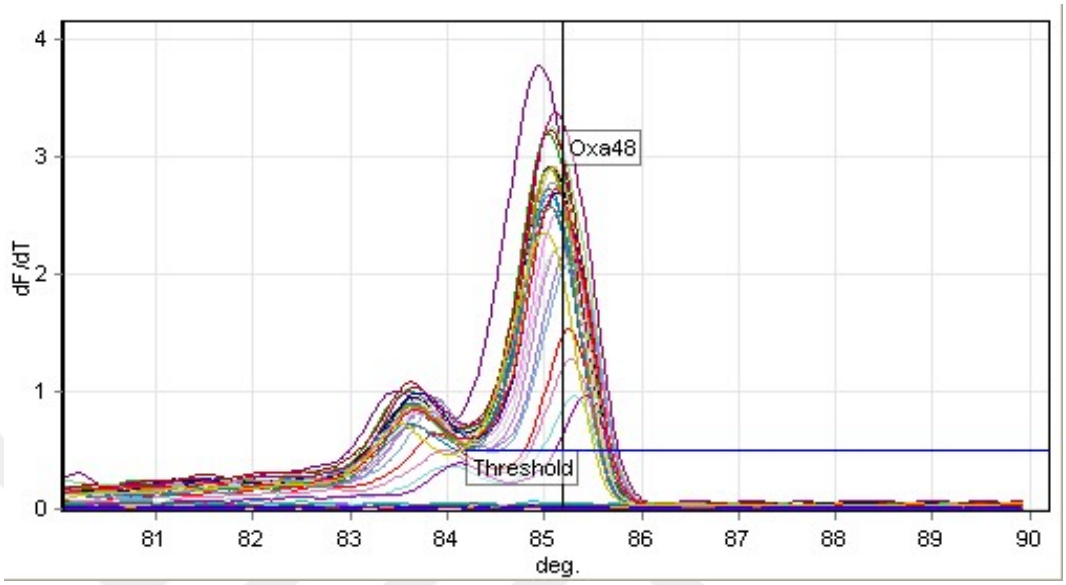


Tür tayininde Vitek-2 GN kartları kullanılmış olup tamamı *Klebsiella pneumoniae* subspecies *pneumoniae* olarak tanımlanan izolatların imipenem, meropenem ve ertapenem için MİK değerleri AST-261 duyarlılık kartları ile belirlenmiştir (Tablo 6).

Tablo 6. KDKP izolatlarının MİK değerleri

	MEROPENE	İMİPENEM	ERTAPENEM
1	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
2	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
3	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
4	I (=2)	I (=2)	**D (>8)**
5	I (=2)	I (=2)	**D (>8)**
6	**D (=8)**	**D (>16)**	**D (>8)**
7	**D (=4)**	I (=2)	**D (=4)**
8	I (=2)	**D (>16)**	**D (=4)**
9	**D (=8)**	**D (=8)**	**D (>8)**
10	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
11	I (=2)	**D (=8)**	**D (>8)**
12	H (<1)	H (<1)	**D (>8)**
13	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
14	**D (=4)**	**D (>16)**	**D (>8)**
15	H (<1)	H (<1)	**D (=4)**
16	**D (=8)**	**D (>16)**	**D (>8)**
17	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
18	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
19	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
20	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
21	I (=2)	I (=2)	**D (>8)**
22	**D (>16)**	**D (=4)**	**D (>8)**
23	**D (=8)**	I (=2)	**D (>8)**
24	**D (=4)**	H (<1)	**D (>8)**
25	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
26	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
27	**D (>16)**	I (=2)	**D (=4)**
28	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
29	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
30	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
31	**D (=4)**	**D (=4)**	**D (>8)**
32	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
33	I (=2)	I (=2)	**D (>8)**
34	I (=2)	**D (>16)**	**D (>8)**
35	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
36	H (<1)	H (<1)	**D (>8)**
37	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
38	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
39	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
40	**D (=4)**	**D (=8)**	**D (>8)**
41	**D (>16)**	**D (=8)**	**D (=4)**
42	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
43	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
44	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**
45	**D (>16)**	**D (>16)**	**D (>8)**

Klebsiella pneumoniae subspecies pneumoniae olarak saptanan izolatlar RT PCR ile OXA direnç genleri açısından araştırılmıştır (Resim 3). Toplam 45 izolatın 27 (%60)'sinde OXA-48 geni tespit edilmiştir.



Resim 3. RT PCR ile OXA-48 geninin araştırılması

OXA-48 geni varlığını saptamada altın standart yöntem olarak kabul edilen PCR sonuçları ile 3 farklı moleküler olmayan test karşılaştırılmıştır.

4.1. TEMOSİLİN DİSK DİFÜZYON TESTİ (TEST 1)

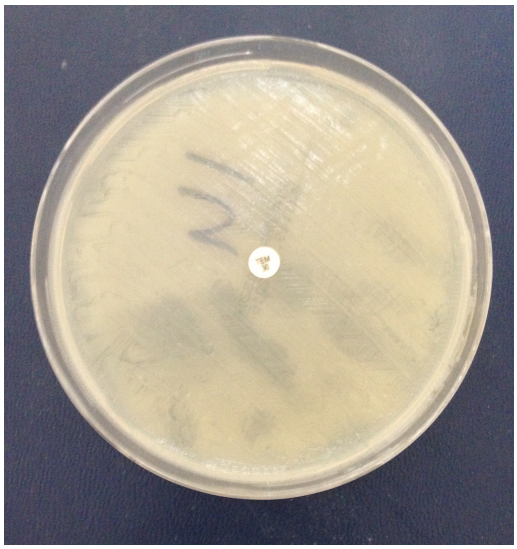
PCR ile OXA-48 geni tespit edilen 27 suşun hepsi temosilin disk difüzyon testi ile yüksek düzey dirençli bulunmuştur. PCR ile OXA-48 geni saptanmayan 18 suşun 14'ü temosilin disk difüzyon testinde duyarlı olarak saptanmıştır. PCR ile OXA-48 geni saptanmayan 4 suş temosilin disk difüzyon testinde dirençli tespit edilmiştir (yalancı pozitiflik). Bu verilere göre test tüm suşların %68.8'ini pozitif %31.1'ini negatif saptamıştır. PCR ile kıyaslandığında duyarlılık %100 özgüllük %77.8 bulunmuştur. Testin PPD %87, NPD %100 olarak bulunmuştur. Testin toplam doğruluğu (accuracy) %91 olarak tespit edilmiştir.

Tablo 7. Temosilin disk difüzyon testinin verileri

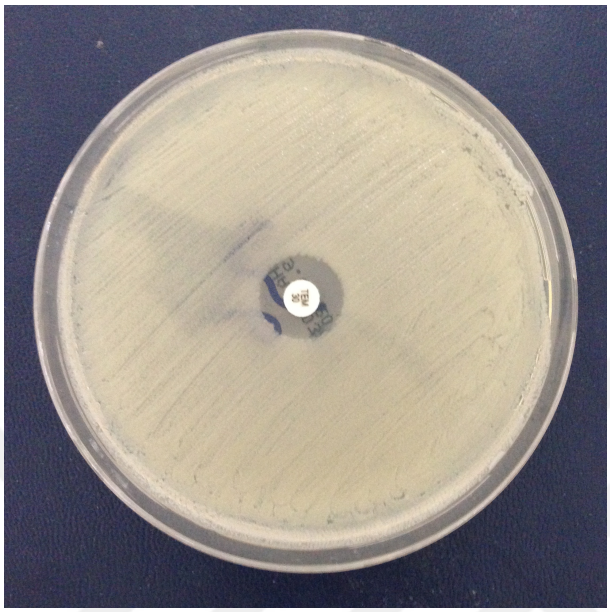
		PCR (altın standart test)		
		Pozitif	Negatif	Toplam
Temosilin disk difüzyon testi	Pozitif	27	4	31
	Negatif	0	14	14
	Toplam	27	18	45

Duyarlılık	%100
Özgüllük	%77.8
PPD	%87
NPD	%100
Toplam doğruluk	%91

Resim 4. Temosilin disk difüzyon testinde dirençli saptanan suş (OXA-48 karbapenemazı pozitif suş)



Resim 5. Temosilin disk difüzyon testinde duyarlı saptanan suş (OXA-48 karbapenemazı negatif suş)



4.2. İMMUNOKROMOTOGRAFİK K-SET TESTİ (TEST 2)

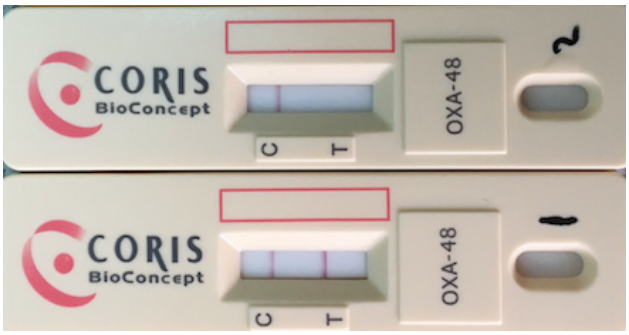
PCR ile OXA-48 geni tespit edilen 27 suşun hepsi K-SET immunkromotografik test ile pozitif olarak tespit edilmiştir. PCR ile OXA-48 geni saptanmayan 18 suşun hepsi K-SET immunkromotografik test ile de negatif olarak tespit edilmiştir. Bu verilere göre test tüm suşların %60'ını pozitif, %40'ını negatif olarak saptamıştır. PCR ile kıyaslandığında duyarlılık %100, özgüllük %100 olarak bulunmuştur. Testin PPD %100, NPD %100 bulunmuştur. Testin toplam doğruluğu (accuracy) %100 olarak bulunmuştur.

Tablo 8. K-Set testinin verileri

		PCR (altın standart test)		
		Pozitif	Negatif	Toplam
K-SET testi	Pozitif	27	0	27
	Negatif	0	18	18
	Toplam	27	18	45

Duyarlılık	%100
Özgüllük	%100
PPD	%100
NPD	%100
Toplam doğruluk	%100

Resim 6. K-SET testi negatif (üstte, tek çizgi) ve pozitif (altta çift çizgi), (C: kontrol çizgisi, T: test çizgisi)



4.3. CHROMID OXA-48 AGARA EKİM (TEST 3)

PCR ile OXA-48 geni tespit edilen 27 suşun hepsi ChromID OXA-48 agarda üremiştir. PCR ile OXA-48 geni saptanmayan 18 suşun 16'sı ChromID OXA-48 agarda üremiştir. PCR ile OXA-48 geni saptanmayan 2 suş ChromID OXA-48 agarda üremiştir (yalancı pozitiflik). Bu verilere göre test tüm suşların %64.4'ünü pozitif, %35.5'ini negatif saptamıştır. PCR ile

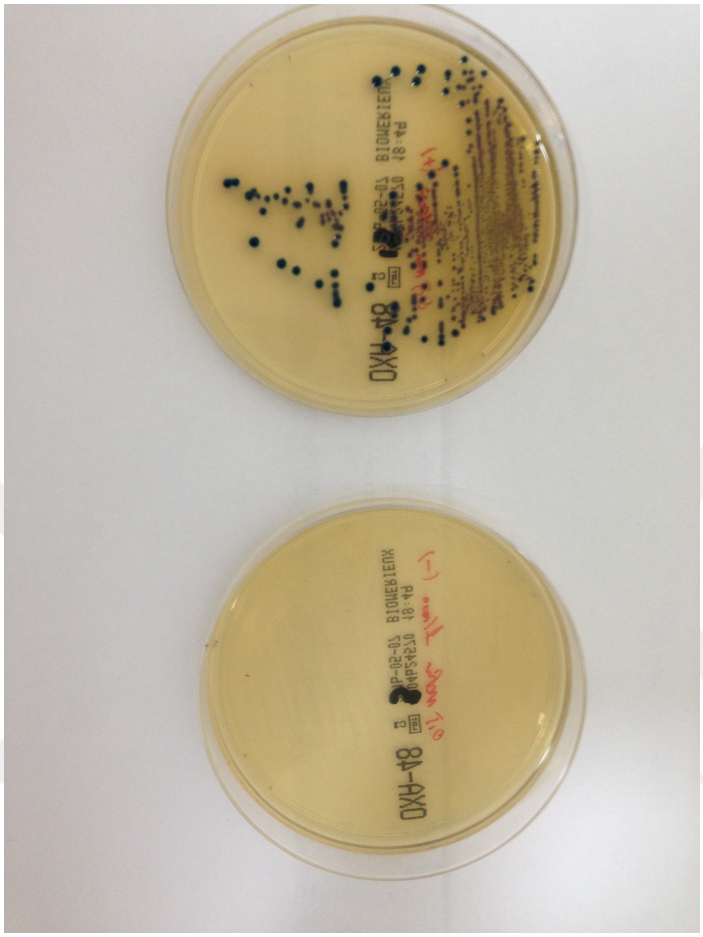
kıyaslandığında duyarlılık %100, özgüllük %88.8 olarak bulunmuştur. Testin PPD %93.1, NPD %100 bulunmuştur. Testin toplam doğruluğu (accuracy) %95.5 olarak bulunmuştur.

Tablo 9. ChromID OXA-48 agar verileri

		PCR (altın standart test)		
		Pozitif	Negatif	Toplam
ChromID OXA-48 agar	Pozitif	27	2	29
	Negatif	0	16	16
	Toplam	27	18	45

Duyarlılık	%100
Özgüllük	%88.8
PPD	%93.1
NPD	%100
Toplam doğruluk	%95.5

Resim 7. ChromID OXA-48 Agara, üstteki resim üreme olan pozitif kabul edilen test sonucu, alttaki resim üreme olamayan negatif kabul edilen test (Test 3)

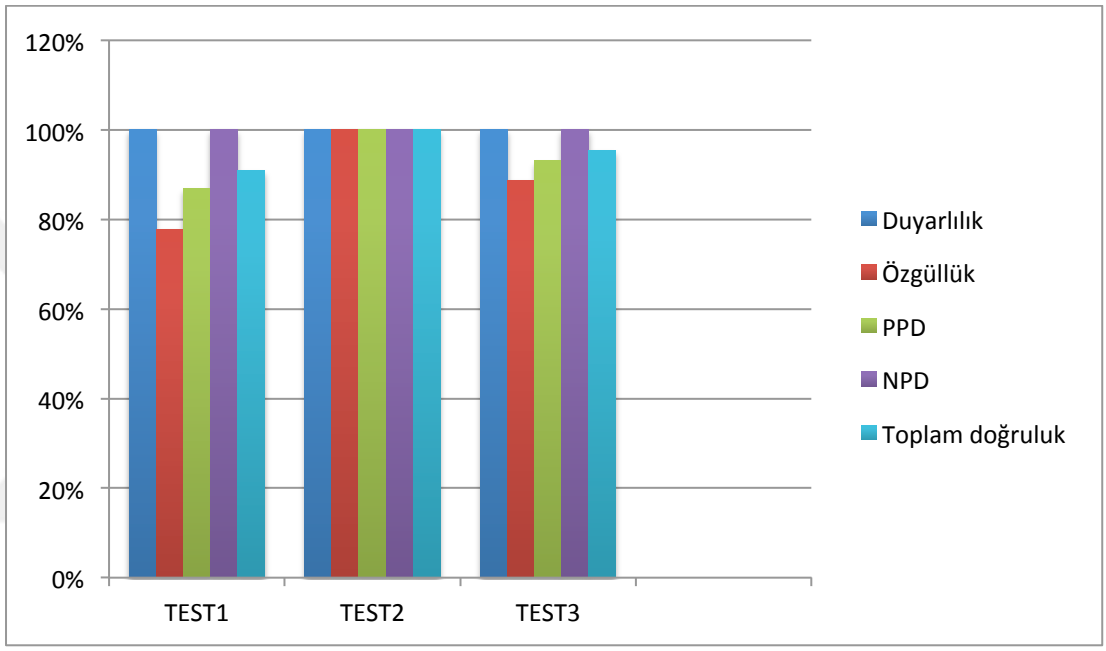


Tablo 10. PCR OXA-48 ile moleküler dışı üç testin kıyaslanması

	Test 1	Test 2	Test 3
Duyarlılık	%100	%100	%100
Özgüllük	%77.8	%100	%88.8
PPD	%87	%100	%93.1
NPD	%100	%100	%100
Toplam doğruluk	%91	%100	%95.5

*Test1: Temosilin disk testi, Test2: K-SET immunokromotografik yöntem, Test3: ChromID OXA-48 agar, PPD: pozitif prediktif değer, NPD: negatif prediktif değer

Şekil 3. PCR OXA-48 ile diğer üç testin birbiriyle kıyaslanması



*Test1: Temosilin disk testi, Test2: K-SET immunokromotografik yöntem, Test3: ChromID OXA-48 agar, PPD: pozitif prediktif değer, NPD: negatif prediktif değer

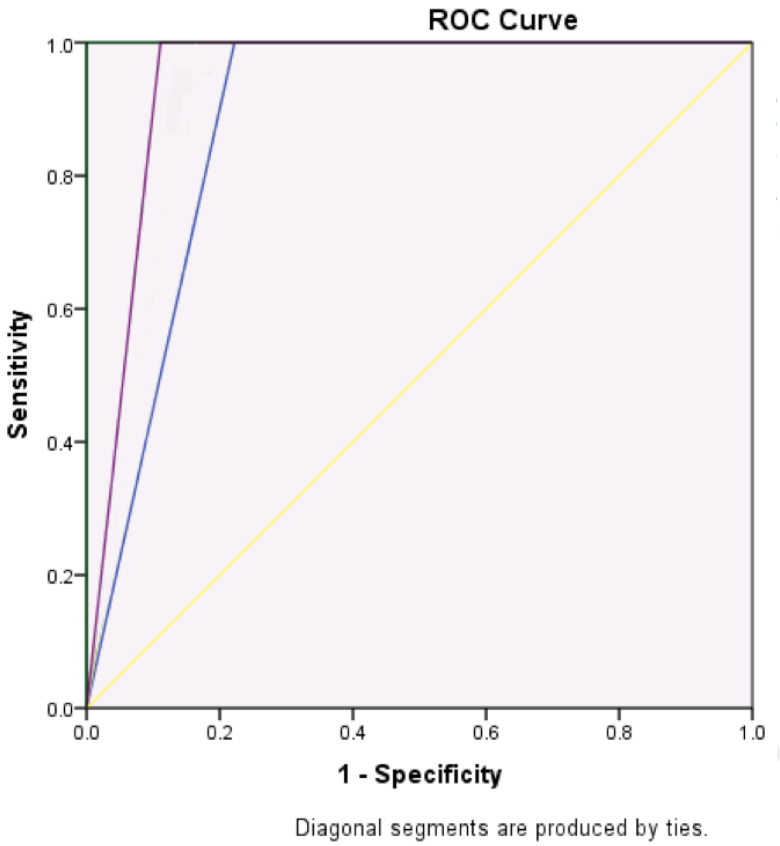
Yukarıdaki sonuçlara göre;

Altın standart olarak aldığımız PCR ile %100 uyumlu olan K-SET testi en başarılı test olurken,

%95.5 toplam doğruluğu ile ChromID OXA-48 agar yöntemi ikinci,

%91 toplam doğruluğu ile Temosilin disk difüzyon yöntemi son sırada yer almıştır.

Roc Curve analizi yapılmış olup şekil 4'deki gibidir. K-set testi çizgisi tam tahmin yapması nedeniyle y ekseni üzerinde hareket etmektedir (şekil 4).



Şekil 4. Roc Curve, temosilin disk testi (mavi çizgi), ChromID OXA-48 agar (mor çizgi), Referans çizgi (sarı çizgi), K-SET testi çizgisi tam tahmin yapması nedeniyle y ekseni üzerinde hareket etmektedir. Bu nedenle grafikte belli olmamaktadır.

İstatistiksel Analizler

İstatistiksel Analizler IBM Statististics 20.0 (SPSS) ile yapılmıştır.

5. TARTIŞMA

Dünyada artan direnç oranları nedeniyle son seçenek ilaç olarak karbapenemlerin korunması gerekliliği öne çıkmıştır. Bu nedenle tüm hastanelerde karbapenem direnci yakından takip edilmektedir. Hızlı tanı, izolasyon ve erken tedavinin başlanması için laboratuvarımızda gerekli önlemler alınmaktadır. Bu açıdan ülkemizde sık rastlanan OXA-48 karbapenemazın saptanması önemlidir.

Yakın gelecekte karbapenemaz sentezleyen bakteriler tarafından iki büyük epidemi yaşanacağı düşünülmektedir. Bunların toplum kaynaklı *E.coli* suşları ve hastane kaynaklı *K.pneumoniae* suşları ile oluşacağı tahmin edilmektedir (118). Bu sebeple, karbapenemaz üreten mikroorganizmaların erken tanısı, nozokomiyal enfeksiyonların önlenmesi açısından önem arz eder (119).

Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* ilk kez Amerika'da 1997'de, ülkemizde ise 2001 yılında izole edilen bir suştan bildirilmiştir. Ardından değişik tarihlerde karbapenem dirençli *K.pneumoniae* hastane epidemilerinin bildirimleri yapılmıştır (19,120). Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2007-2009 senelerinde SENTRY çalışması dahilinde 42 merkezden gönderilmiş hastane enfeksiyonu etkeni 2049 *K.pneumoniae* izolatında karbapenem direnci %6.1 olarak tespit edilmiştir (121).

Karbapenemaz araştırılması için ülkemizde 2007 yılında HİTİT-2 adlı çalışma yapılmıştır. Çok merkezli yapılan çalışmanın sonuçlarına göre *E.coli* suşlarında karbapenem direnci gözlenmezken, *K.pneumoniae* suşlarında imipenem direnci %3.2 olarak tespit edilmiştir (122). EARRS-2008 çalışmasında ise Türkiye'de karbapenem direncinin %1-5 arasında olduğu tespit edilmiştir (123).

Ülkemizde 2014 yılında yapılmış bir çalışmada GSBL pozitif *K.pneumoniae*'da imipeneme %10.5, meropeneme %7 ve ertapeneme %11.6 oranında direnç bulunmuştur (30).

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKP) izolatları ile yapılan bir çalışmada 301 suş ile çalışılmıştır. Bunların 244'ü kandan, 32'si balgamdan, 8'i idrardan, 4'ü trakeal aspirattan, 3'ü yaradan, 10'u diğer materyal örneklerinden izole edilmiştir (126).

İngiltere'de 2012 yılında yapılan bir araştırmada 13 KDKP izolatının altısı idrardan, dördü kandan, ikisi yaradan, biri balgamdan izole edilmiştir (127).

Çalışmamıza dahil olan 45 izolat sırasıyla trakeal aspirat 18 (%40), yara 10 (%22.2), idrar 8 (%17.7), kan 7(%15.5) ve balgam 2 (%4.4) örneklerinden izole edilmiştir. Trakeal aspirat örneklerinden daha fazla KDKP suşu elde edilmesi dikkat çekicidir.

Umman'da yapılan bir araştırmada 16 KDKP suşunun izole edildiği materyallerin altısı üroloji kliniğinden, dördü yoğun bakımdan, altısı ise diğer klinik servislerden gönderilmiştir (128).

Çalışmamızda KDKP suşlarının %53.4'ü yoğun bakım ünitesinden elde edilmiştir. Bunu genel cerrahi, üroloji, nöroloji, nefroloji servisleri izlemiştir. Yoğun bakımdan gönderilen 24 örneğin 16'sı trakeal aspirat örneğidir.

Hastane infeksiyonuna yol açan mikroorganizmaların kaynağı ve bulaş yollarının belirlenmesi ile kontrol önlemlerinin alınması, epidemiyolojik çalışmaların temel noktasını oluşturur (129). Hastane infeksiyonları kontrol araştırmalarında bir salgının olup olmadığına karar vermede, türlerin hızlı ayrımı en çok önem arz eden mevzudur (130). Standardize edilmiş antibiyotik duyarlılık testlerinin yaygın kullanılması birçok hastane salgınında ilk adım niteliğindedir (131). Günümüzde altın standart olarak kullanılan testler moleküler yöntemlerdir. Moleküler yöntemlerin pahalı olması ve ekipman gerektirmesi, rutin koşullarda kullanılabilecek moleküler dışı yöntemlere yönelik araştırmaları gündeme getirmiştir (132).

Ülkemizde OXA-48 kaynaklı karbapenemaz ilk kez İstanbul'da bir hastanede yatmakta olan bir hastanın idrar kültüründe üreyen *K.pneumoniae'da* tespit edilmiştir. En çok Türkiye'de izole edilmekle birlikte çok yakın zamanda Lübnan ve Belçika'daki *K.pneumoniae* suşlarında da tanımlanmıştır. Bu direnç geni Akdeniz ve Avrupa ülkelerinde de giderek yaygınlaşmaktadır (133,134,135).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda OXA-48 direnç geni en sık rastlanan karbapenemaz tipidir. Aktaş ve ark. (136) meropeneme dirençli 18 K. pnemoniae ve bir E.coli suşunda PCR ve DNA sekanslama yöntemi ile OXA-48, IMP, VIM ve SPM- 1 genlerini araştırmışlardır. E.coli suşunda IMP-1 ve bütün K.pnemoniae izolatlarında OXA-48 (%100) tespit etmişlerdir. Ülkemizde *K.pnemoniae* izolatlarında OXA-48 karbapenemaz sık rapor edilmekle birlikte Aktaş ve ark.'nın bu yayını ilk IMP-1 üreten E. coli'yi saptayan çalışma olmuştur.

Ktari S. ve ark. (137) Tunus'da yaptıkları 2011 yılındaki bir çalışmada karbapenemlere azalmış duyarlılığı olan *K.pneumoniae*'larda OXA-48 pozitifliğini %13.7 olarak bulmuşlardır.

Dimou V. ve ark. (127) 2012 yılında İngiltere'de yaptıkları bir çalışmada karbapenemlere azalmış duyarlılığı olan *K.pneumoniae*'larda OXA-48 pozitifliğini %18.9 oranında tespit etmişlerdir.

Hammoudi ve ark. (139) 2012 yılında Lübnan'da karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık saptanan 102 Enterobacteriaceae üzerinde yaptıkları çalışmada 31 izolatta (15 *K.pneumoniae*, 8 *E.coli,* 4 *S.marcescens*, 3 *E.cloacae* ve 1 *M.morganii*) OXA-48 geni saptamışlar aynı çalışmada OXA-48 negatif olarak belirlenen izolatlarda, karbapenem direncine neden olarak, kazanılmış AmpC üretimi (MOX, CIT), azalmış dış membran geçirgenliği ve efluks pompası olduğunu bildirmişlerdir.

Percin ve ark. (138) Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde rektal sürüntü örneklerinden izole edilen KDKP izolatlarının direnç genlerini araştırmışlar ve 33 suşun 19'unda (%57.5) OXA-48 direnç geni saptamışlardır. Onüçünde (%39.4) hiçbir direnç geni saptanmamıştır.

Çalışmamızda KDKP suşlarındaki OXA-48 direnç geni RT-PCR ile araştırılmış olup %60 oranında pozitiflik saptanmıştır. Diğer ülkelerin çalışmalarıyla kıyaslandığında çalışmamızdaki direnç oranı daha yüksektir. Fakat Türkiye'deki çalışmalarda genel olarak diğer ülkelere kıyasla daha yüksek oranda OXA-48 direnç geni tespit edildiği görülmektedir. Bu durum OXA-48 direnç geninin ilk olarak ülkemizde bulunması ve ülkemizde endemik bir direnç olması nedeniyle beklediğimiz bir sonuçtur.

Woodfort ve ark. (140)'nın 2014 yılında 108 adet OXA-48 direnç genine sahip Enterobacteriaceae'da disk difüzyon yöntemi ile değerlendirdikleri bir çalışmada yüksek düzey temosilin direnci (MIK≥128), %90,7 oranında olarak bildirilmiştir. Aynı çalışmada 2172 adet OXA-48 direnç geni negatif olduğu bilinen bakteride yapılan çalışmada %11.8 oranında yüksek düzey temosilin direnci (MIK≥128) saptanmıştır.

Çakar ve ark (30) çok merkezli bir çalışmada, 323 OXA-48 direnç geni taşıyan suşu araştırmışlardır. Temosilin disk difüzyon, tüm OXA-48 direnç geni taşıyan suşlarda dirençli olarak bulunmuştur. Bu başarısına rağmen OXA-48 direnç geni taşımayan 20 suşu da temosiline dirençli olarak bulmuşlardır.

Çalışmamızda OXA-48 varlığını tespit etmede temosilin disk difüzyon yönteminin duyarlılığı %100, özgüllüğü %77.8 olarak bulunmuştur. RT PCR ile OXA-48 geni negatif bulunmuş 4 suşun temosilin disk difüzyon ile dirençli bulunması testin özgüllüğünü düşürmektedir. Tüm OXA-48 karbapenemazları yakalamasına rağmen yalancı pozitiflikleri vardır. Bu bulgulara dayanarak yüksek düzey temosilin direnci OXA- 48 tip direnci belirlemede tek kriter olarak yetersiz kalmaktadır. Bununla birlikte çalışmalardaki bulgular, yüksek düzey temosilin direncinin yokluğunda OXA-48 pozitifliğinin dışlanabileceğini, temosilinin karbapenemaz tanımlamasında kullanılabilecek tek bir test olmaktan ziyade algoritmanın bir parçası olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

İmmünolojik reaksiyon temelli immünokromatografik test olan OXA-48 K-Set'te, kromatografik nitroselülöz membrana emdirilmiş antikor, örnekte bulunan antijenle birleşmesi sonucu oluşan kompleks yapının renk değişimine neden olması prensibine dayanmaktadır (113,114).

Glupczynski ve ark. (113) yaptıkları çalışmada iki ticari lateral akımlı immünokromatografik ürünü değerlendirmiştir. Bu çalışma sonucunda OXA-48 K-SeT (Coris BioConcept) ve KPC-K-SeT (Coris BioConcept) testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır.

Notake ve ark. (114) IMP enziminin hızlı saptanması amacıyla geliştirilmiş Quick Chaser IMP (Saga, Japan) ticari kitini değerlendirdikleri çalışmada, IMP enziminin % 100 duyarlılık ve özgüllükte olduğunu bildirmişlerdir.

Wareham ve ark. (124) OXA-48 K-SeT immünokromatografik testinin OXA-48 karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae kökenlerinde duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda immünokromatografik test (OXA-48 K-SeT test) yönteminin duyarlılığı %100, spesifikliği %100 olarak bulunmuştur. Sonuç olarak biz de benzer çalışmalarda olduğu gibi OXA-48 tipi karbapenemaz tanımlamasında kullanılabilecek testler arasında en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu tespit ettik. Nispeten pahalı bir test olmasına rağmen OXA-48'in sıkça görüldüğü ülkemizin yoğun bakım ünitelerinde kullanılmasının maliyet etkinliği açısından düşünüldüğünde daha avantajlı olduğu kanısındayız.

Karbapenamazları genel olarak saptayanlar dışında, sadece OXA-48 karbapenemaz sentezleyen suşları üreten kromojenik agarlar da mevcuttur.

ChromID CARBA besiyeri ve imipenemli MacConkey agar (MCI) yöntemlerini değerlendiren bir çalışmada, chromID CARBA besiyerinin % 96.5 duyarlılık MCI yönteminin %89 duyarlılıkta olduğu gözlenmiştir. Bu testler arasında en yüksek özgüllük, %91.2 ile chromID CARBA besiyerinde saptanmıştır (125).

Girlich ve ark.'ı (141) 2014 yılında 117 KDKP suşuyla yaptığı çalışmada SUPERCARBA, ChromID OXA-48 ve ChromID CARBA besiyerlerinin OXA-48 karbapenemazı tespit etme performansını araştırmışlardır. OXA-48 karbapenemazı saptamada, SUPERCARBA testinin duyarlılığı %98,2 özgüllüğü %53, ChromID OXA-48 agar ekim duyarlılığını %94,7 özgüllüğü %100, ChromID CARBA'nın duyarlılığını %22,8 özgüllüğü

%68 olarak bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre karbapenemazları saptamaya yönelik besiyerleri OXA-48 tipi karbapenemazları da tespit ettiğinden duyarlılıkları yüksek olmasına rağmen sadece OXA-48 tipi karbapenemaz üreten suşları tespit eden ChromID OXA-48 besiyerinin daha spesifik bir test olduğu saptanmıştır.

Zarakolu ve ark.'nın (112) yaptığı çalışmada yatan hastalardan alınan 302 adet rektal swap örneği ChromID OXA-48 agara ekim yapılarak OXA-48 taraması yapılmıştır. PCR ile OXA-48 direnç geni varlığı doğrulanmış 31 örneğin 25'i bu yöntem ile saptanabilmiştir.

Çalışmamızda OXA-48 varlığını tespit etmede ChromID OXA-48 agar yönteminin duyarlılığı %100, spesifikliği %88.8 olarak bulunmuştur. RT PCR ile OXA-48 geni negatif bulunmuş iki suş kromojenik agarda üreyerek yanlış pozitifliğe neden olmuştur. Zarakolu ve ark 'nın (112) yaptığı çalışmada rektal swap kullanıldığı için duyarlılığı düşük bulunmuştur. Ancak bu çalışma KDKP taşıyıcılığını saptamış ve chromID OXA-48 agarın önemini bir kez daha vurgulamıştır. Çalışmamızdaki bulgular yurtiçinde ve yurtdışında yapılan çalışmalarla benzerlik göstermektedir.

ChromID OXA-48 agar konvansiyonel yöntemlerle kıyaslandığında pahalı bir testtir. Bu nedenle rutin çalışmalarda uygulanması zor olan testin yoğun bakım gibi izolasyon gerektiren hasta materyallerinde kullanılabileceği düşüncesindeyiz.

ChromID OXA-48 agarın henüz yeni bir test olması nedeniyle yeterli çalışma yoktur. Çalışmamızın başka çalışmalara rehber olacağına inanıyoruz.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Ülkemizde *Enterobacteriaceae*'da karbapenem direnci yapılan çalışmalarda yüksek olarak bildirilmektedir (17,18). Direnç genlerinin hızla yayılması ve hastane epidemilerine yol açması mümkündür. Hastane kaynaklı mikroorganizmalarda karbapenemaz üretimi ve yayılımı çok yüksek oranda olmaktadır. Bunun sonucu olarak; yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara sebebiyet vermektedir. Bu nedenle, özellikle yoğun bakım servislerindeki infeksiyonlarda karbapenem duyarlılığını doğru ve en kısa sürede belirlemek, etken bakterinin izole edildiği hasta için yaşamsal önem taşımaktadır.

Doğru ve hızlı laboratuvar tanısı infeksiyon kontrolü açısından çok önemlidir. Hızlı testlerin pahalı oluşu rutin kullanımda zor olmakla birlikte seçilmiş hastalarda kullanmanın uzun dönemde tedavi sürelerini ve iş gücünü azaltması nedeniyle maddi ve manevi olarak daha karlı olabileceği görüşündeyiz. Çalıştığımız testler direnci bulmakta hızlı ve doğru sonuç verdiği sürece direncin yayılımını azaltabilecektir.

Tüm bu veriler ışığında test sonuçları değerlendirildiğinde yapılan benzer çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. İmmunokromotografik K-SET testi en yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Diğer testlerin duyarlılıkları %100 olmasına rağmen yanlış pozitifliklerden dolayı özgüllükleri daha düşüktür. K-SET testinin OXA-48'in endemik olarak bulunduğu bölgelerdeki yoğun bakım hastaların Gram (-) üremelerinde rutine girebileceği kanısındayız.

Diğer taraftan ise ChromID OXA-48 agar ve temosilin disk difüzyon testinin KDKP yönünden tarama yapılmasında ve tanı algoritmasında bir basamak kullanılabileceği ve böylece oluşabilecek salgınların önüne geçilebileceği kanısındayız.

7. KAYNAKLAR

1. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, Fendri C, Belhadj O, Ben-Mahrez K. Molecular epidemiology of an outbreak of multi-resistant Klebsiella pneumoniae in a Tunisian neonatal ward. J Med Microbiol 2003; 52: 427-33.

2. Pool K. Resistance to beta-lactam antibiotics. Cell Mol Life Sci 2004; 61: 2200-23.

3. Gupta V. An update on newer beta-lactamases. Indian J Med Res. 2007;126(5):417-27.

4. Yu WL, Chuang YC, Walther-Rasmussen J. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology,detection, treatment and infection control. J Microbiol Immunol Infect 2006; 39: 264-77.

5. Kim SY, Park YJ, Yu JK, et al. Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in Klebsiella pneumoniae isolates. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 57: 85-91.

6. Jeong SH, Bae IK, Lee JH, et al. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase produced by clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli from a Korean nationwide survey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2902-6.

7. Bratu S, Landman D, Haag R, et al. Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med 2005; 165: 1430-5.

8. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.

9. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. Curr Med Chem 2009; 16: 564-75.

10. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of Klebsiella pneumoniae producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. J Antimicrob Chemother 2008; 62: 1261-4. Epub 2008/09/25.

11. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56: 367-72.

12. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control 2006; 34 (5 Suppl 1): S20-8; discussion S64-73.

13. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. Drugs 2007; 67: 1027-52.

14. Shah PM. Parenteral carbapenems. Clin Microbiol Infect 2008; 14 (Suppl 1): 175-80

15. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. Clinical Microbiology Newsletter 2009; 31: 55-62.

16. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. Clin Microbiol Rev 2007; 20: 440-58.

17. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogunc D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gulay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupinar B, Darka O, Akgun Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Berktas M, Yaman G. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. J Chemother 2009; 21: 383-9.

18. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2007; 59: 453-7.

19. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 15-22.

20. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in Klebsiella pneumoniae in Istanbul, Turkey. Chemotherapy 2008; 54: 101-6.

21. Bush K. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. Crit Care. 2010; 14(3): 224.

22. Woodford N, Dallow J WT, Hill RL, et al. Ertapenem resistance among Klebsiella and Enterobacter submitted in the UK to a reference laboratory. Int J Antimicrob Agents 2007; 29: 456-9.

23. BaşustaoğluA.KlinikMikrobiyoloji.9.Baskıed.Ankara:AtlasKitapçılık;2009.

24. Montgomerie JZ.Epidemiologyof Klebsiella and hospital associated nfections. Reviews of infectious diseases. 1979;1(5):736-53.

25. Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America. 2004;39(11):1654-9.

26. Yang CC, Yen CH, Ho MW, Wang JH. Comparison of pyogenic liver abscess caused by non-Klebsiella pneumoniae and Klebsiella pneumoniae. Journal of microbiology, immunology, and infection = Wei mian yu gan ran za zhi. 2004;37(3):176-84.

27. The Enterobacteriaceae. Winn Jr WC, Allen SD, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Procop G,Woods GL. In: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 6th. Ed Lippincott Williams & Wilkins. 2007: 228-302.

28. Greenwood D, Barer M, Slack R, Irving W. Klebsiella, Enterobacter, Proteus and other enterobacteria. In. Medical Microbiology. Eighteen edition. 2012;290-3.

29. Topcu AW, Soyletir G, Doganay M. Bakteriyel İnfeksiyonlar.In. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevi. 2008;1575-79.

30. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Öğünç D, Baysan B, Çöplü N, Çağatay M, Kılıç A, Baysallar M, Bakıcı Z, Çelik C, Gülay Z, Aydemir Ş, Tünger A, Kılıç H, Erçal B, Aşçı Z, Zer Y, Büyüktaş A, Ay S, Aktaş Z, Kayacan Ç, Bayramoğlu G, Aydın F, Dündar D, Hasdemir U, Ayaş R, Yanık K, Günaydın M, Güdücüoğlu H, Parlak M, Türkiye'de 2014 Yılı İçinde İzole Edilen Karbapeneme Dirençli Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Araştırılması, Mikrobiyol Bul 2016; 50(1): 21-33.

31. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S, et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010;16(2):102-11.

32. Cohen MJ, Block C, Levin PD, Schwartz C, Gross I, Weiss Y, et al. Institutional control measures to curtail the epidemic spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a 4-year perspective. Infection control and hospital epidemiology. 2011;32(7):673-8.

33. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, et al. Colistin-resistant isolates of Klebsiella pneumoniae emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2007;59(4):786-90.

34. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. International journal of antimicrobial agents. 2011;37(5):415-9.- 37

35. Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinos J, Dimitroulia E, Poulou A, et al. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. International journal of antimicrobial agents. 2011;37(3):244-7.

36. Essack SY. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. Pharmaceutical Research 2001;18:1391-9.

37. Gür D. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (eds). İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel tıp kitabevleri, 2002: 182-93.

38. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Michael AP. Antibakteriyel ajanlar. Klinik mikrobiyoloji 9. Baskı 2009;70:1077-1113.

39. Thomson, J. M. Bonomo, R. A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: Beta-lactams in peril! Curr. Opin. Microbiol. 2005; 8: 518-24.

40. Clinical and Laboratory Standards Institute 2016. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement. CLSI document M100S26. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

41. Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V, and study group. Iimipenem/silastatin (1,5 g daily) versus Meropenem (3,0 g daily) in patients with intraabdominal infections: Results of prospective, randomized, multicentre trial. Scand J Infect Dis 1997;29:503-8.

42. Bimbaum J, Kahan FM, Kroop H. Carpapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. Am J Med 1985:78(Suppl 6A):3-21.

43. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. J Antimicrob Chemother 1995;36(Suppl A):1-17.

44. White Friedrich L, Burgess D, Warkentın D, Bosso J. Comperative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 1996;40(4).904-8.

45. Gill, C. J.; Jackson, J. J.; Gerckens, L. S.; Pelak, B. A.; Thompson, R. K.; Sundelof, J. G.; Kropp, H.; Rosen, H. In vivo avtivity and pharmacokinetic evaluation of a novel long-acting carbapenem antibiotic, MK-826 (L-749,345).

46. Keating GM, Perry CM. Ertapenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections. Drugs, 2005; 65: 2151-78.

47. El-Gamal MI, Oh CH. Current status o carbanapenem antibiotics. Curr Top Med Chem, 2010; 10: 1882-97.

48. Başaran S, Korten V. Doripenem: Klinik Uygulamada Yeni Bir Karbapenem. Klimik Dergisi 2010; 23(1):2-5.

49. Fuchs PC, Barry AL, Brown SD. In vitro activities of ertapenem (MK-0826) against clinical bacterial isolates from 11 North American medical centers. Antimicrob. Agents Chemother, 2001; 45: 1915-8.

50. Yellin AE, Hassett JM, Fernandez A et al. Ertapenem monotherapy versus combination therapy with ceftriaxone plus metronidazole for treatment of complicated intra-abdominal infections in adults. Int. J. Antimicrob. Agents, 2002: 20: 165-73.

51. Saba R, Usluer G. Ertapenem FLORA 2008; 13(ek5): 3-19

52. Hernandez JR, Velasco C, Romero L, Martinez- Martinez L, Pascual A. Comparative in vitro activity of ertapenem against extended-spectrum β-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated in Spain Int J Antimicrob Agents 2006; 28: 457-9.

53. Lee SC, Huang SS, Lee CW, Fung CP, Lee N, Shien WB, Siu LK Comparative antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative bacteria from community-acquired bacteremia to ertapenem in Taiwan. BMC Infect Dis. 2007;7:79

54. Bazan JA, Martin SI, Kaye KM. Newer beta-lactam antibiotics:doripenem, ceftobiprole, ceftaroline, and cefepime. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23(4): 983-96.

55. Matthews SJ, Lancaster JW. Doripenem monohydrate, a broadspectrum carbapenem antibiotic. Clin Ther. 2009; 31(1): 42-63.

56. Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyolojive kontrol. Flora, 2002; 7: 135–41.

57. Yucesoy M, Yulug N, Kocagöz S, Unal S, Çetin S, Çalangu S. Antimicrobial resistance of gram negative isolates from intensive care units in Turkey: comparison to previous three years. J Chemother, 2000; 12:294–98.

58. Gülay Z. Antimikrobiyal İlaçlara Direnç. Temelve Klinik Mikrobiyoloji. Ustaçelebi Ş, Güneş Kitabevi. 1999;91-108.

59. Cunha B A. Antibiotic resistance. Antibiotic therapy, Part I. Medical Clinics of North America, 2000;84: 1407- 29.

60. Mayer K H, Opal J M, Medeiros A A: Mechanisms of antobitic resistance. Mandell, Bennet T, Dolin (eds) Principles and Practice of İnfectious Diseases, 1994; 13:1015–18.

61. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. Antimicrob Agents Chemother, 1986; 30:1–5.

62. Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics mediated by alterations ofpenicillinbinding proteins. In: Bryan LE (Ed.). Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, 1989; 77–100.

63. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. Scand J Infect Dis 1991;(Suppl 78):7–16.

64. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Charactarization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbial Rev 2001;14:933–51.

65. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Michael AP. Antibakteriyel İlaçlara Direnç Mekanizmaları. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı,71:1114-45.

66. Murakami S, R. Nakashima, E. Yamashita, A. Yamaguchi. 2002. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. Nature 419:587-593.

67. Lee A, W. Mao, M.S. Warren, A.Mistry, K. Hoshino, R. Okumura, H. Ishida, O. Lomovskaya. 2000. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance. J. Bacteriol.182:3142-3150.

68. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo β-lactamase from a nosocomial isolate of Pseudomonas aeruginosa in France. Emerg. Infect. Dis. 2000; 6: 84-5.

69. Bush K. Characterization of Beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 1989; 259–263.

70. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi 1996;1:80-86.

71. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları Ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevi. 2008;243-257.

72. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. Clin Microbial Rev 2001;14:933–51.

73. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. Am J Infect Control 2006; 34 (5 Suppl 1): S20-8; discussion S64-73.

74. Yüce A. Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. Klimik Dergisi 2001;14 (2): 42–46.

75. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolizing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997;41:223-32.

76. Wei Z, Du X, Yu Y, Shen P, Chen Y. Plasmid-Mediated KPC-2 in a Klebsiella pneumoniae Isolate from China. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51(2): 763–5.

77. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing Klebsiella pneumoniae in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. J Antimicrob Chemother 2008; 62(6): 1257-60

78. Queenan, A. M., C. Torres-Viera, H. S. Gold, Y. Carmeli, G. M. Eliopoulos, R. C. Moellering, Jr., J. P. Quinn, J. Hindler, A. A. Medeiros, and K. Bush. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse Serratia marcescens strains. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 3035–3039.

79. Alba, J., Y. Ishii, K. Thomson, S. Moland Ellen, and K. Yamaguchi. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing-beta-lactamase. Antimicrob. Agents Chemother. 2005; 49: 4760–4762.

80. Walsh, T. R., M. A. Toleman, L. Poirel, and P. Nordmann. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clin. Microbiol. Rev. 2005; 18: 306–325.

81. Rasmussen Y J., and N. Hoiby. OXA-type carbapenemases. J.Antimicrob. Chemother. 2006; 57: 373–383.

82. Ambler, R. P., A. F. W. Coulson, J. M. Frere, J. M. Ghuysen, B. Joris, M. Forsman, R. C. Levesque, G. Tiraby, and S. G. Waley. A Standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. Biochem. J. 1991; 276:269–270.

83. Gales, A. C., D. J. Biedenbach, P. Winokur, D. M. Hacek, M. A. Pfaller, and R. N. Jones. Carbapenem-resistant Serratia marcescens isolates producing Bush group 2f β-lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2001;39:125-127.

84. Massidda O, Rossolini G M, and Satta G. The Aeromonas hydrophila cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo-β-lactamases. J. Bacteriol. 1991; 173: 4611–7.

85. Lim H M, Pene J J and Shaw R W. Cloning, nucleotide sequence and expression of the Bacillus cereus 5/B/6 β-lactamase II structural gene. J. Bacteriol. 1988; 170: 2873-8.

86. Chen Y H, Succi J, Tenover F C and T M. Koehler. β-Lactamase genes of the penicillin-susceptible Bacillus anthracis Sterne strain. J. Bacteriol. 2003; 185: 823-30.

87. Walsh T R, Hall L, Assinder S J, Nichols W W, Cartwright S J, MacGowan A. P, Bennett P M. Sequence analysis of the L1 metallo-β-lactamase from Xanthomonas maltophilia. Biochim. Biophys. Acta. 1994; 1218: 199–201

88. Rossolini G M, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio M L, Galleni M, Frere J M, Amicosante G. Cloning of a Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A β-lactamase related to the Bacteroides cephalosporinases and the VEB–1 and PER β-lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43: 2193-9.

89. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T and Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo-β-lactamases from Chryseobacterium (Flavobacterium) indologenes. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44: 3028-34.

90. Saavedra M J, Peixe L, Sousa J. C, Henriques I, Alves A and Correia A. Sfh–1, a subclass B2 metallo-β-lactamase from a Serratia fonticola environmental isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 2330-3.

91. Nataraj G. New Delhi metallo beta-lactamase: what is in a name? J Postgrad Med 2010; 56: 251-2.

92. Strateva T, Yordanov D. Pseudomonas aeruginosa-a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009;58 (9):1133-1148.

93. Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa. J Antimicrob Chemother 1998: 42; (2) 128-31.

94. Heritier C, Poirel L, Aubert D et al. Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of Acinetobacter baumannii. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47: 268-73.

95. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P.Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(3):1369-73.

96. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother. 2001 Apr;45(4):1151-61.

97. Coskun O, Erdem H, Avci A. Management of community-acquired acute bacterial cystitis in Turkey. Turk J Med Sci 2011; 41: 149-57.

98. Budak S, Aktas Z, Erdem H. Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvardan Kliniğe Karbapenemazlar. J Infect Microb Antimicrob. 2012;1:11.

99. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Mi riagou V et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriacae. Clin Microbiol Infect. 2012;18:432–8.

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

101. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clinical microbiology reviews. 2005;18(2):306-2

102. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clinical microbiology reviews. 1995;8(4):557-84.

103. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y et al. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing Klebsiella pneumoniae with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 2010;48:4417-25.

104. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. International journal of antimicrobial agents. 2011;37(5):415-9.

105. Livermore DM, Tulkens PM. Temocillin revived. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2009;63(2):243-5.

106. Adams-Haduch JM, Potoski BA, Sidjabat HE, Paterson DL, Doi Y. Activity of temocillin against KPC-producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;53(6):2700-1.

107. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gerard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem- resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. International journal of antimicrobial agents. 2012;39(2):168-72.

108. Hartl R, Widhalm S, Kerschner H, Apfalter P. Temocillin and meropenem to discriminate resistance mechanisms leading to decreased carbapenem susceptibility with focus on OXA-48 in Enterobacteriaceae.

Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;19(5):E230-2.

109. Bernabeu S, Poirel L, Nordmann P. Spectrophotometry-based detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012;74:88–90.

110. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis. 2012;18:1503–7.

111. Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S et al. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan, and evaluation of two chromogenic media. J. Antimicrob. Chemother. 2011;66:2288–94.

112. Zarakolu P, Day KM, Sidjabat EH, Kamolvit W, Lanyon CV, Cummings SP, Paterson DL, Akova M, Perry JD et al. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID OXA-48, for recovery of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from patients at a university hospital in Turkey. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2015 Mar; 34(3): 519-25.

113. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria, J Antimicrob Chemother 2016 may ; 71(5); 1217-22.

114. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo- β-lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting gram-negative rods by immunochromatography assay, J Clin Microbiol 2013;51(6):1762-8.

115. Naas T, Cuzan G, Truong H, Bernabeu S, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray, the check-points ESBL/KPC array, for rapid detection of TEM, SHV and CTX-M extended-spectrum beta-lactamases and KPC-2 carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(8):3086-92.

116. Miller SA, Hindler JA, Chengcuenca A, Humphries RM, Use of Ancillary Carbapenemase Tests to Improve Specificity of Phenotypic

Definitions for Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2017 Mar 29. pii: JCM.00157-17.

117. Madkour LA, Soliman MS, Hassan DM, Soliman NS, ElMahdy YA. Detection of carbapenemase-producers: Evaluating the performance of the carbapenem inactivation method and Carba NP test versus multiplex PCR. J Glob Antimicrob Resist. 2017 Mar 9;9:10-14.

118. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Emerg Infect Dis 2011; 17(10): 1791-8.

119. Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis 2005;41:S276-8.

120. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF et al. Carbapenem-resistant Escherichia coli and Klebsiella Pneumoniae isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemases and outher memb- rane protein loss, Int J Antimicrob Agents 2008;31(6): 523-6.

121. Kaiser DM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in Klebsiella pneumoniae carbapenemase-positiveK.pneumoniae in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2013; 76(3): 356-60.

122. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogunc D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gulay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupinar B, Darka O, Akgun Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Berktas M, Yaman G. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. J Chemother 2009; 21: 383-9.

123. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, http://www.hpsc.ie/hpsc/A-Z/MicrobiologyAntimicrobial Resistance/ European AntimicrobialResistanceSurveillance SystemEARSS/(accessed in February 2011).

124. Wareham DW, Shah R, Betts JWet al. Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid

detection of OXA-48-like carbapenemases in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2016; 54: 471–3.

125. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M et al. Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemases-producing enterobacteriaceae detection during rectal scree- ning, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014;33(1):35- 40.

126. Tzouvelekis L.S, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in Klebsiella pneumoniae and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012 Oct;25(4):682-707. doi: 10.1128/CMR.05035-11.

127. Dimou V., Dhanji H., Pike R., Livermore D.M., Neil Woodford. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. J Antimicrob Chemother 2012; 67: 1660–1665 doi:10.1093/jac/dks124 Advance Access publication 24 April 2012.

128. Dortet L., Poirel L., Al Yaqoubi F., Nordmann P., NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. Clinical Microbiology and Infection. 2012 may; 18(5) : E144-8.

129. Mete A. Metisilin dirençli Staphylococcus aureus suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve PCR-RFLP ile tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara. 2005.

130. Church DL, Chow BL, Lloyd T, Gregson DB. Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant Staphylococcus aureus. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 69(1): 30-7.

131. Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant Staphylococcus aureus by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. J Clin Microbiol 2002; 40(6): 2119-25.

132. Huang YC, Su LH, Wu TI, et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in Taiwan. J Clin Microbiol 2004; 42(1): 307-10.

133. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. Future Microbiol 2007; 2: 501-12.

134. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, et al. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible Klebsiella pneumoniae strain from Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2008;52: 3463-4.

135. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing Klebsiella pneumoniae in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother. 2013 Jan;68(1):84-8.

136. Aktas Z, Satana D, Kayacan Ç, Özbek B, Gürler N, Soner A et al. Carbapenem resistance in Turkey: Repeat report on OXA-48 in Klebsiella pneumoniae and first report on IMP-1 beta-lactamase in Escherichia coli, African Journal of Microbiology Research. 2012;6(17):3874-78.

137. Ktari S., Mnif B., Louati F, Rekik S, Mezghani S, Mahjoubi F and Hammami A. Spread of Klebsiella pneumoniae isolates producing OXA-48 b-lactamase in a Tunisian university hospital. J Antimicrob Chemother . 2011jul; 66(7) : 1644-6.

138. Percin D, Colakoğlu S, Durmaz S, Ekincioğlu P. Rektal sürüntü örneklerinde karbapeneme dirençli klebsiella pneumoniae taranmasında klasik yöntemlerle ertapenemli emb besiyerinin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2012; 46(4): 546-552.

139. Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Aires J, Adaime A, Barakat A, Fayad N, et al. Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon: surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in 10 hospitals over a one-year period. International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases. 2014;29:139-44.

140. Woodford N, Pike R, Meunier D, Loy R, Hill R, Hopkins KL. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of Escherichia coli, Klebsiella spp. and Enterobacter spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2014;69(2):564-7.

141. Girlich D, Anglade C, Zambardi G, Nordmann P. Comparative evaluation of a novel chromogenic medium (chromID OXA-48) for detection of OXA-48 producing Enterobacteriaceae, Diagn Microbiol Infect Dis 2014, 77(4): 296-300.

.