



T.C.

SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**POZİTİF KAN KÜLTÜRÜ ŞİŞELERİNDEN KARBAPENEMAZ
ÜRETEK *ENTEROBACTERALES* SUŞLARININ HIZLI TESPİTİ
VE KARBAPENEMAZ KARAKTERİZASYONU AMACIYLA
KOMBİNASYON DİSK TESTLERİNİN DOĞRUDAN BETA-
LAKTAM İNAKTİVASYON METODUNA DAYALI OLARAK
KULLANIMININ ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Tuğba AYVALIK

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

**Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 9027 no'lu proje ile desteklenmiştir.**

ISPARTA – 2024

BEYAN

“Pozitif Kan Kültürü Ş şelerinden Karbapenemaz  reten Enterobacterales Suşlarının Hızlı Tespiti ve Karbapenemaz Karakterizasyonu Amacıyla Kombinasyon Disk Testlerinin Doğrudan Beta-laktam İnaktivasyon Metoduna Dayalı Olarak Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması” adlı uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi SDÜ Tıp Fakültesi Uzmanlık Tez  nerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hazırlayan

Dr. Tuğba AYVALIK

Danışman

Prof. Dr. Emel SESL   ET N

TEŞEKKÜR

‘Hangisi daha önemli, yolculuk mu, varacağın yer mi, yoksa sana kimin eşlik ettiği mi?’ Yol zaman zaman çetin virajlarıyla baş döndürse de her kayboluşun yeni bir keşfe kapı araladığını fark ettiren bir yolculuk yaşattığı ve bu yolda bana öncülük ettiği, elini üzerimden bir an bile çekmediği, her zaman yanımda olduğu için değerli tez danışmanı hocam Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN’e,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, her daim destek olan değerli hocalarım Prof. Dr. Buket CİCİOĞLU ARIDOĞAN, Doç. Dr. Mümtaz Cem ŞİRİN ve Doç. Dr. Server YAĞCI’ya,

Dolu dolu dört yıl birçok anı yaşadığım ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum araştırma görevlisi, biyolog ve laborant arkadaşlarıma,

Tezimin istatistik analizine katkıda bulunan Doç. Dr. Gökçe İŞCAN ve Dr. Öğr. Üyesi Adnan KARAİBRAHİMOĞLU’na,

Tez projemi maddi olanak sağlayarak destekleyen S.D.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’ne teşekkürlerimi sunuyorum.

Yaşam yolunda ilk öğretmenim, bugün olduğum kişide en büyük katkısı olan, her zorlukta hep bir çıkış yolu bulan, her zaman tam destekçim canım anneciğim Sabahat AYVALIK’a, hayat planımı oluşturmamda en çok emeği olan ve disiplinli bir insan olmamın başrol örneği babacığım Şaban AYVALIK’a, bir kardeşim olması için dua ettiğim günlerden varlığına her gün şükrettiğim ve hayallerim için beni en çok coşkulandıran canım kardeşim Hasan Tarık AYVALIK’a, uzaklardan benimle her an gurur duyduğundan emin olduğum çocukluğumun kahramanı meleğimiz Mine AYVALIK’a ve birçok anımda her zaman yanımda olduğu için kendimi çok şanslı hissettiren canım sevgilim Cemal RÜZGARKESEN’e,

İnandıklarımın hiçbir zaman vazgeçmediğim için kendime,

Yüreğinde iyilik ve koşulsuz sevgi barındıran herkese sonsuz teşekkürler...

Dr. Tuğba AYVALIK

Isparta, 2024

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLERİN DİZİNİ.....	ix
RESİMLER DİZİNİ	x
GRAFİKLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Enterobacterales</i>	4
2.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	4
2.2.1. Genel Özellikleri.....	4
2.2.2. Neden Olduğu Enfeksiyonlar	4
2.2.3. Virülans Faktörleri.....	5
2.2.4. Laboratuvar Tanısı.....	5
2.2.5. Tedavisi ve Antibiyotik Direnci	6
2.3. <i>Escherichia coli</i>	8
2.3.1. Genel Özellikleri.....	8
2.3.2. Neden Olduğu Enfeksiyonlar	8
2.3.3. Virülans Faktörleri.....	9
2.3.4. Laboratuvar Tanısı.....	10
2.3.5. Tedavisi ve Antibiyotik Direnci	10
2.4. Beta-laktam Antibiyotikler.....	11
2.4.1. Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması.....	11
2.4.2. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	11
2.5. Beta-laktamazların Sınıflandırılması.....	12
2.5.1. Grup 1 Sefalosporinazlar	14
2.5.2. Grup 2 Serin Beta-laktamazlar	14
2.5.3. Grup 3 Metallo-beta-laktamazlar.....	16
2.5.4. Grup 4 Beta-laktamazlar	17

2.6. Karbapenemler	17
2.6.1. Karbapenem Dirençli <i>Enterobacterales</i>	17
2.6.2. Karbapenem Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları.....	18
2.6.2.1. Karbapenemazlar.....	18
2.6.3.1. Ambler Sınıf A Karbapenemazlar.....	18
2.6.3.2. Ambler Sınıf B Karbapenemazlar	19
2.6.3.3. Ambler Sınıf D Karbapenemazlar.....	19
2.7. Dünyada ve Ülkemizdeki <i>Enterobacterales</i> İzolatlarının Karbapenem Direnç Epidemiyolojisi	19
2.8. <i>Enterobacterales</i> Takımında Karbapenemaz Üretimini Saptama Yöntemleri	23
2.8.1. Karbapenemaz Üretimini Tarama Yöntemleri	23
2.8.2. Karbapenemaz Üretimini Doğrulama Yöntemleri.....	24
2.8.2.1. Fenotipik Yöntemler	24
2.8.2.1.1. Kombinasyon Disk Testi	25
2.8.2.1.2. Biyokimyasal (Kolorimetrik) Testler	26
2.8.2.1.3. Karbapenem İnaktivasyon Metodu.....	27
2.8.2.1.3.1. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu	27
2.8.2.1.3.2. EDTA'lı Karbapenem İnaktivasyon Metodu.....	28
2.8.2.1.4. Karbapenem Hidrolizinin Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi ile Saptanması.....	28
2.8.2.1.5. Lateral Akım Yöntemleri	28
2.8.2.1.6. Kültür Tabanlı Yöntemler	29
2.8.2.1.7. Otomatize Sistem.....	30
2.8.2.2. Genotipik Yöntemler.....	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	32
3.1. Etik Kurul Bilgileri.....	32
3.2. Güç Analizi ve Çalışmaya Alınan Suşların Sayısının Belirlenmesi.....	32
3.3. Pilot Çalışma	32
3.4. Çalışmaya Alınan Suşların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları	33
3.4.1. BD Phoenix 100.....	33
3.5. Validasyon Suşlarının Seçimi	34
3.6. Klinik Suşların Seçimi.....	34
3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenem Direnç Genlerinin Saptanması	35
3.8. Kullanılan Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması.....	35

3.8.1. Trypticase Soy Broth	35
3.8.2. Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth	35
3.9. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu.....	36
3.10. Kombinasyon Disk Testi	38
3.10.1. D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus Disk Seti.....	38
3.10.2. D68C-MASTDISCS® Combi ESBL & AmpC Tanımlama Disk Seti...	42
3.11. Kombinasyon Diskleri Kullanılarak Doğrudan Beta-laktam İnaktivasyon Metodu (dBLIMplus).....	44
3.11.1. Kan Kültürü Şişelerine Aktarılmak Üzere Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması	44
3.11.2. Kan Kültürü Şişelerine Bakterilerin Aktarılması ve Kan Kültürü Şişelerinin İnkübasyona Bırakılması.....	45
3.11.3. Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Şişelerine dBLIMplus Uygulaması..	45
3.11.4. dBLIMplus'ın Değerlendirilmesi	46
3.12. İstatiksel Analiz.....	46
4. BULGULAR	49
4.1. Validasyon Suşlarının Özellikleri	49
4.1.1. Validasyon Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Durumları	50
4.1.2. Validasyon Suşlarının Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Bulguları	51
4.1.3. Validasyon Suşlarının Kombinasyon Disk Testi Bulguları.....	52
4.1.4. Validasyon Suşlarının dBLIMplus Bulguları	53
4.1.5. Validasyon Verileri ile Belirlenen Değerlendirme Kriterleri	54
4.2. Klinik Suşların Özellikleri.....	55
4.2.1. Klinik Suşların Antibiyotik Duyarlılık Durumu.....	56
4.2.2. Klinik Suşların Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Bulguları..	57
4.2.3. Klinik Suşların Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	58
4.2.4. Klinik Suşların Kombinasyon Disk Testi Bulguları	62
4.2.5. Klinik Suşların dBLIMplus Bulguları	64
5. TARTIŞMA	74
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	89
ÖZET.....	90
ABSTRACT	91
KAYNAKLAR	92

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µg	: Mikrogram
µl	: Mililitre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMC	: Amoksisilin-klavulanik asit
AN	: Amikasin
ATLAS	: Antimikrobiyal Test Yönetimi ve Sürveyansı
CAESAR	: Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı
CARB-10	: Genişlemiş spektrumlu karbenisilinaz
CarbaNP	: Carbapenemase Nordmann-Poirel
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CIM	: Karbapenem inaktivasyon metodu
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
COL	: Kolistin
CRO	: Seftriakson
CZA	: Seftazidim-avibaktam
ÇİD	: Çoklu ilaç direnci
DAEC	: Diffüz adheran <i>E. coli</i>
dBLIM	: Doğrudan beta-laktam inaktivasyon metodu
DPA	: Dipikolinik asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
EARS-Net	: Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı
ECDC	: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi
eCIM	: EDTA'lı karbapenem inaktivasyon metodu
ECOFF	: EUCAST epidemiyolojik eşik değeri
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
EMB	: Eosin Methylene Blue

EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
FDA	: ABD Gıda ve İlaç Dairesi
GES	: Guiana extended spectrum
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
HÜS	: Hemolitik üremik sendrom
IMI	: İmipenem hidrolize edici Beta-laktamaz
IMP	: İmipenem
KAMHB	: Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth
KDE	: Karbapenem dirençli <i>Enterobacterales</i>
KDT	: Kombinasyon disk testi
KNE	: Karbapenemaz negatif <i>Enterobacterales</i>
KPC	: <i>K. pneumoniae</i> karbapenemaz
KPE	: Karbapenemaz pozitif <i>Enterobacterales</i>
LPS	: Lipopolisakkarit
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
mCIM	: Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu
MEM	: Meropenem
MHA	: Mueller-Hinton agar
MHT	: Modifiye Hodge testi
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
mm	: Milimetre
MUG	: 4 -metilumbelliferil-beta-D-glukuronid
NDM	: New Delhi MBL
NMC	: Not metallo-enzyme carbapenemase
OXA	: Oksasilinaz
PBA	: Fenil boronik asit
PBP	: Penisilin bağlayıcı protein
PFGE	: Pulsed-field jel elektroforez
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu

REP-PCR	: Tekrarlayan ekstragenik palindromik sekans bazlı PZR
RND	: Resistance nodulation division
SME	: <i>Serratia marcescens</i> enzim
TEM	: Temosilin
TSB	: Trypticase soy broth
UAMDSS	: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi
VIM	: Verona integron-encoded MBL
WGS	: Tüm genom dizileme



ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu uygulama şeması.....	37
Şekil 3.2. Kan kültürlerine aktarılmak üzere bakteriyel süspansiyon hazırlama şeması	44
Şekil 3.3. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerine dBLIMplus uygulama basamakları.....	48
Şekil 4.1. dBLIMplus değerlendirme kriterleri şeması.....	55
Şekil 4.2. OXA-48 pozitif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği.....	59
Şekil 4.3. KPC pozitif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği	59
Şekil 4.4. NDM pozitif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği ...	60
Şekil 4.5. VIM/IMP pozitif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği.....	60
Şekil 4.6. NDM ve OXA-48 birlikte pozitif olan suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği	61
Şekil 4.7. KPC ve OXA-48 birlikte pozitif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği.....	61
Şekil 4.8. Karbapenemaz negatif suşun BD MAX TM Check-Points CPO testi sonuç örneği.....	62

RESİMLER DİZİNİ

Sayfa

Resim 3.1. mCIM için bakteri süspansiyonu hazırlanması (A) ve MEM diski ile inkübasyona bırakılması (B).....	36
Resim 3.2. İnkübasyonu tamamlanan MEM diskinin çıkarılması (A) ve 0,5 McFarland <i>E. coli</i> ATCC 25922 suşu ekilmiş MHA'ya diskin yerleştirilmesi (B)	37
Resim 3.3. 18-24 saat inkübasyon süresi sonunda mCIM değerlendirilmesi.....	38
Resim 3.4. Karbapenemaz negatif suşun KDT örneği	40
Resim 3.5. KPC pozitif suşun KDT örneği	41
Resim 3.6. OXA-48 pozitif suşun KDT örneği	41
Resim 3.7. NDM pozitif suşun KDT örneği.....	42
Resim 3.8. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden dBLIMplus uygulamak üzere bakteri süspansiyonunun elde edilmesi.....	47
Resim 3.9. Bakteri süspansiyonunun kombinasyon diskleri üzerine aktarılması ve <i>E. coli</i> ATCC 25922 referans suşu ekilmiş MHA'da dBLIMplus uygulaması.....	48
Resim 4.1. Sırasıyla karbapenemaz negatif suşun (A-B-C), OXA-48 pozitif suşun (D-E-F), MBL pozitif suşun (G-H-I), KPC pozitif suşun (J-K-L) 6-12-18. saatlerde dBLIMplus inhibisyon zon çapları	73

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa

Grafik 2.1. Kombinasyon disk testlerinin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması	26
Grafik 4.1. Validasyon suşlarının mCIM ile belirlenen meropenem zon çaplarının dağılımı	51
Grafik 4.2. Validasyon gruplarına göre kombinasyon setinin her bir diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı farklarının ortalamaları (mm) ve A ve E diskinin 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapının ortalamaları (mm)	54
Grafik 4.3. Klinik suşların mCIM ile belirlenen meropenem zon çapları dağılımı ..	58
Grafik 4.4. Klinik suşların direnç genlerine göre sınıflandırılmış olarak kombinasyon setinin diskleri ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapları ve zon çapı farklarının ortalamaları (mm)	71

TABLÖLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Bush-Jacoby Beta-laktamaz Sınıflandırmasının Ambler Sınıflandırmasıyla Karşılaştırılması.....	13
Tablo 2.2. Karbapenemaz Aktivitesi Olan Beta-laktamazlar	18
Tablo 2.3. Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacterales</i> için EUCAST’ın Belirlediği Klinik Sınır Değerleri ve Tarama Eşik Değerleri	23
Tablo 4.1. Validasyon için çalışmaya dahil edilen 60 <i>Enterobacterales</i> suşunun izole edildiği klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı.....	49
Tablo 4.2. Validasyon suşlarının grupları ve türlere göre dağılımları	49
Tablo 4.3. Validasyon suşlarının antibiyotik duyarlılık durumları	50
Tablo 4.4. Validasyon suşlarının mCIM, KDT ve PZR bulguları.....	52
Tablo 4.5. Validasyon gruplarına göre her bir kombinasyon disk seti diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm) ile zon çapı farklarının aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm)	53
Tablo 4.6. Klinik çalışma suşlarının izole edildiği örnek türü ve servislere göre dağılımı	55
Tablo 4.7. Karbapenemaz pozitif ve negatif klinik suşların antibiyotik duyarlılık durumları.....	56
Tablo 4.8. Çeşitli karbapenemaz direnç genine sahip klinik suşların antibiyotik duyarlılık durumları	57
Tablo 4.9. Klinik suşların mCIM, KDT, PZR ve dBLIMplus bulguları	67
Tablo 4.10. Klinik suşların direnç genlerine göre her bir kombinasyon disk seti diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm) ile zon çapı farklarının aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm)	69
Tablo 4.11. dBLIMplus ile ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilen ve PZR ile uyumsuz bulunan suşların dBLIMplus testinde ölçülen 6.-12.-18. saatlerdeki zon çapları (mm).....	70
Tablo 4.12. Klinik suşların dBLIMplus ve KDT bulgularının karşılaştırması.....	72

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda artan antimikrobiyal direnç Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından halk sağlığını tehdit eden önemli bir sorun olarak bildirilmektedir (1,2). Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların başlıca sorumlu etkenlerinden olan *Enterobacterales*'in tedavisinde son tercih olan karbapenem grubu antibiyotiklere karşı da direnç giderek artmaktadır (3-5). Dünya Sağlık Örgütü'nün ilk olarak 2017 yılında ve daha sonra 2024 yılında yayımladığı 'bakteriyel öncelikli patojenler' listesinde karbapenem dirençli *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatları öncelikli kritik grupta yer almaktadır (6). *Enterobacterales*'te karbapenem direnci temelde karbapenemaz enzimi üretimi ile olmakla beraber, membran geçirgenliğinin azalmasıyla birlikte genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) veya AmpC beta-laktamaz aşırı üretimi ile de olabilmektedir (7-9). Bu enzimlerin bakteriler arasında hızla yayılabilmesi nedeniyle varlıklarının erken tespit edilmesi hem tedavinin doğru planlanabilmesi hem de dirençli bakterilerin yayılımının önlenmesi için oldukça önemlidir.

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST), rutin duyarlılık testlerinde karbapenemlere duyarlılığın azaldığı tespit edilen *Enterobacterales* izolatlarında karbapenemazların saptanması için fenotipik yöntemlerin uygulanmasını önermektedir (10). Önerilen fenotipik testler arasında kombinasyon disk testi (KDT), karbapenem inaktivasyon metodu (CIM), biyokimyasal (kolorimetrik) testler, immünokromatografik lateral akım testleri ve Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (MALDI-TOF MS) gibi testler bulunmaktadır. Karbapenemaz üretiminin tespit edilebilmesinde moleküler testler de kullanılmaktadır. Bu testler altın standart olarak kabul edilmekle birlikte pahalıdır, yalnızca spesifik karbapenemaz genlerini hedefler ve bu testlerin yapılması deneyimli personel gerektirmektedir (11).

Fenotipik testlerden KDT'de çeşitli inhibitör ajanlarla kombine edilmiş karbapenem diski kullanılmaktadır. İnhibitör ajanla kombine edilen karbapenem diskinin inhibisyon zonu tek başına karbapenem disk zonu ile karşılaştırılarak kombine disk zon çapında anlamlı artış olup olmadığı değerlendirilmektedir. Yapılan

alışmalar ile valide edilmiş yöntem olması, enzim sınıflandırılmasını sağlaması ve hazır ticari disklerin temin edilebilmesi nedeniyle KDT avantajlı bir yöntemdir. Bununla birlikte sonuçları değerlendirmek için 18 saatlik bir sürenin olması rutin uygulamada daha hızlı testlerin geliştirilmesine ihtiyaç doğurmaktadır.

Van der Zwaluw ve ark. karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için duyarlı, özgül ve ucuz bir test olarak CIM'i bildirmişler ve 2015 yılında Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) bazı değişiklikler yaparak karbapenemaz üretiminin tespiti için CIM'i onaylamıştır (12,13). Karbapenem inaktivasyon metodu, bir karbapenem diskinin karbapenemaz üreten bakteri süspansiyonu ile inkübasyonu sonrası antibiyotiğin enzim tarafından parçalanması ve etkinliğini kaybetmesi esasına dayanır. Kolay uygulanabilirliği ve maliyet açısından ucuz bir yöntem olması nedeniyle diğer fenotipik testlere iyi bir alternatif olabileceği öne sürülerek yapılmış birçok karşılaştırmalı çalışma bulunmaktadır. Sonuçları değerlendirmek için 18 saatlik bir sürenin olması yöntemin geliştirilmesi gereken yönü olarak bildirilmektedir. Bunun yanında yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünü artırmak amacıyla yöntemin modifikasyonuna yönelik birçok çalışma yapılmıştır (14). 2017 yılında CLSI tarafından *Enterobacterales* ailesindeki bakteriler için karbapenemaz üretiminin fenotipik olarak test edilmesinde modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) onaylanmıştır (15). Karbapenem inaktivasyon metoduna kıyasla mCIM'de inkübasyon süresi uzatılarak testin duyarlılığı ve özgüllüğü artmıştır; ancak mCIM serin karbapenemazları, metallo-beta-laktamazlardan (MBL) ayırt edemediği için 2018 yılında Sfeir ve ark. tarafından, B sınıfı enzimleri A ve D sınıfı enzimlerinden ayırt etmek için EDTA inhibisyonunun kullanıldığı mCIM yönteminin bir çeşidi olan EDTA'lı karbapenem inaktivasyon metodu (eCIM) tanımlanmıştır ve eCIM kullanımı CLSI tarafından önerilmiştir (16-18).

Karbapenem inaktivasyon metodlarının, kültürde izole edilmiş bakteri kolonisinin kullanımını gerektirmesi karbapenemaz aktivitesinin hızlı tespitini sınırlamaktadır. Bianco ve ark. 2020 yılında yayınlanan çalışmalarında *Enterobacterales* izolatlarında pozitif kan kültürü şişelerinden doğrudan karbapenemaz veya GSBL aktivitesinin hızlı tespiti için, CIM'den esinlenerek yeni bir yöntem kurgulamış, doğrudan beta-laktam inaktivasyon metodu (dBLIM) olarak adlandırılan bu yöntem ile karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'i pozitif kan

kültürü ŖiŖelerinden 7 saatten daha kısa sürede tespit edebildiklerini doğrulayan deneysel kanıtlar sunmuŖlardır (19). Bu alıŖma doğrudan karbapenemaz tespiti yapılan ilk alıŖma niteliğindedir. Karbapenem inaktivasyon metodu ve mCIM testleri, 18 ile 24 saat içinde en iyi performansla karbapenemazların tespit edilmesini sağlamakta; dBLIM ise 6 saatte sonuç vermektedir (12,14,19). Doğrudan beta-laktam inaktivasyon metodu karbapenemaz aktivitesi tespitinde %99'un üzerinde duyarlılıkta bulunmuŖ, karbapenemaz karakterizasyon tespiti yapılmamıŖ olması alıŖmanın sınırlılığı olarak bildirilmiŖtir (19).

Bu tez alıŖmasında, dBLIM'in kombinasyon disk testine dayalı fenotipik yöntemlerle birlikte kullanımının (dBLIMplus) karbapenemaz üreten *Enterobacterales* suŖlarının pozitif kan kültürü ŖiŖelerinden hızlı tespitinde ve karbapenemaz karakterizasyonunda etkinliğinin araŖtırılması amalanmıŖtır. Beta-laktamaz üretiminin tespiti ve karakterizasyonunun pozitif kan kültürü ŖiŖelerinden doğrudan yapılmasının antimikrobiyal yönetim ve enfeksiyon kontrol uygulamaları açısından hız kazandıracadı gibi, uygunsuz antimikrobiyal kullanımını sınırlayarak antimikrobiyal direncin azalmasına da katkı sağlaması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacterales*

Enterobacterales, Gammaproteobacteria sınıfına dahil, sporsuz fakültatif anaerobik Gram negatif basil şeklinde görülen bakteri takımıdır. *Enterobacterales* takımında *Enterobacteriaceae*, *Erwinaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* ve *Budvicaceae* olmak üzere yedi aile yer almaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesi, *Enterobacterales* takımının en geniş üye grubunu oluşturmaktadır (20).

Enterobacteriaceae ailesinde yer alan bakteriler toprakta, suda, bitkilerde, hayvanların ve insanların intestinal sisteminde bulunabilmektedir. *Enterobacteriaceae* üyeleri pnömoni, peritonit, menenjit, sepsis, üriner ve gastrointestinal sistem enfeksiyonları gibi hem toplum kökenli hem de hastane kaynaklı enfeksiyonların en yaygın patojenlerinden biri olarak bilinmektedir (21).

2.2. *Klebsiella pneumoniae*

2.2.1. Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinin *Klebsiellae* soyunda yer alan *Klebsiella* cinsi bakterilerden *Klebsiella pneumoniae* türü klinik laboratuvarlarda en sık izole edilen etkenlerden biridir (20). Ölümcül pnömoni etkeni olarak Carl Friedlander tarafından 1882 yılında “Friedlander basili” olarak adlandırılmış ve bu adlandırma 1886 yılına kadar devam etmiştir. 19. yüzyılın sonlarında Edwin Klebs’in adına ithafen *K. pneumoniae* olarak adlandırılmıştır. İnsanlarda özellikle gastrointestinal sistemin normal florasında yaygın bulunmak üzere nadir de olsa orofarenks florasında da bulunabilmektedir (20,22).

2.2.2. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Hastane kaynaklı enfeksiyonların %3-7’sinden *K. pneumoniae*’nin sorumlu olduğu bilinmektedir (23). *Klebsiella pneumoniae* normal florada bulunabilmesi nedeniyle bu etkene bağlı enfeksiyonlar kişinin kendi mikrobiyotasından da

kaynaklanabilmektedir (24). Özellikle diabetes mellitus, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan hastalıkları olan immun sistemi baskılanmış kişilerde fırsatçı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Yaptığı enfeksiyonlar arasında öne çıkanlar üriner sistem enfeksiyonu ve pnömonidir. Primer bakteriyemi yapmakla beraber mesane veya akciğerdeki primer enfeksiyona bağlı sekonder yayılımdan kaynaklı sekonder bakteriyemiler de görülmektedir. Ayrıca menenjit, akciğer ve karaciğer abseleri gibi çeşitli enfeksiyonlara da neden olabilmektedir (24).

2.2.3. Virülans Faktörleri

En önemli virülans faktörü kapsülüdür. Kapsül; konakçı hücreler tarafından bakterinin fagositozunu engeller ve dendritik hücrelerin olgunlaşmasını indükleyerek konakçı immun sistem hücrelerinin antibakteriyel aktivitesini nötralize etmektedir. Gram negatif bakterilerin dış yüzeyini kaplayan lipopolisakkarit (LPS), litik membran atak kompleksinin oluşumunu önleyerek virülansta rol oynamaktadır (25). Bakterinin hayatta kalması için gerekli demir alımını sağlayan sideroforlar da virülans faktörüdür (22). Özellikle sideroforların artan aktivitesi hipermukoviskoz fenotipler ile ilişkilendirilmiştir. Sınırlı da olsa üreaz aktivitesinin de virülans ile ilişkili olabileceği bilinmektedir. Tip 1 fimbrialar hücre içi bakteri toplanmasında etkili olduğu ve tip 3 fimbrialar da biyofilm oluşumuna katkı sağladığı için virülansta etkilidir. Fimbrialar ve kapsül tarafından biyofilm oluşumunun kolaylaştığı yapılan çalışmalarla tespit edilmiştir. Biyofilm oluşumu konakçı ölümüne yol açtığı ve antimikrobiyallere karşı direnci arttırdığı için virülansta da rol oynamaktadır (26).

2.2.4. Laboratuvar Tanısı

Laboratuvarlarda *K. pneumoniae* izolatları kan, idrar, balgam, trakeal aspirat, yara, beyin omurilik sıvısı ve abse gibi çeşitli klinik örneklerden izole edilmektedir (27). *Klebsiella*; genişliği 0,3-1,0 µm ile uzunluğu 0,6-6,0 µm değişen, kapsüllü, hareketsiz, bir bakteri cinsidir (28). Besiyeri plaklarında büyük, mukoid koloniler görüldüğünde *Klebsiella* cinsi akla gelmelidir (20). Kanlı agarda 3-4 mm boyutunda mukoid koloniler ve seçici besiyeri olan MacConkey agarda laktoz fermentasyonu sonucu asit üretimi nedeniyle pembe-mor renkte, büyük, mukoid koloniler şeklinde görülmektedir. Dizi analizlerinden elde edilen veriler sonucunda *Klebsiella* cinsinin

heterojen olduğu bulunmuş ve üç filogenetik kümeye ayrılmıştır. *Klebsiella pneumoniae*'nin homolog DNA'lara sahip üç alt türü de (*K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*) küme 1'de yer almaktadır. Bu üç alt tür biyokimyasal özelliklerine göre farklılık gösterebilmektedir (29).

Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae laktozdan gaz oluşumu ve malonat oluşumu pozitif, indol negatif, metil kırmızısı negatif, sitrat pozitif, lizin dekarboksilaz pozitif bir türdür. Voges-Proskauer ve üreaz pozitifliği ile *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* diğer iki alt türden ayrılabilir. *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis* farklı olarak metil kırmızısı pozitifdir. *Klebsiella pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae*'dan malonat oluşturmaya ayrılmaktadır (20).

Tiplendirme biyokimyasal testlerle olabileceği gibi otomatize tanımlama sistemleri ve moleküler yöntemlerle de yapılabilir.

2.2.5. Tedavisi ve Antibiyotik Direnci

Ampisilin, amoksisilin ve tikarsilin direnci *K. pneumoniae* türünde beklenen direnç fenotipleridir (10). Sıklıkla tedavide beta-laktam antibiyotikler, aminoglikozidler ve florokinolonlar tercih edilmektedir. *Klebsiella pneumoniae*, çoklu ilaç direnci (ÇİD) gözlenen enfeksiyon etkenlerinden biridir ve bu durum antimikrobiyal yönetimi zorlaştırmaktadır (22).

Aminoglikozidler 1940'tan beri kullanılan, bakteri protein sentezini inhibe ederek etki gösteren antibiyotiklerdir. Kullanıldığı süre zarfında *K. pneumoniae* aminoglikozidlere adenilasyon, asetilasyon veya fosforilasyon gibi ilaç modifiye edici enzimler de dahil olmak üzere birçok antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirmiştir. *Klebsiella pneumoniae*'de aminoglikozidlere karşı kromozomal direnç esas olarak atım pompa sistemindeki değişiklikler, porin kaybı gibi sebeplerle oluşan hücre membranındaki geçirgenliğin modifikasyonu ve aminoglikozid modifiye edici enzim genleri ile oluşmaktadır (30).

Florokinolonlar 1960'tan beri kullanılan, DNA replikasyonunu engellemek için DNA giraz'ı hedef alan antibiyotiklerdir. *Klebsiella pneumoniae*'nin

florokinolonlara karşı direncinin nedenleri arasında hedef gendeki mutasyon, atım pompası sentezi, modifiye edici enzimler ve hedef koruma proteinlerinin modifikasyonu yer almaktadır (31).

Hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan protein (PBP)'lere bağlanarak etki gösteren beta-laktam antibiyotikler 1940'lı yıllardan beri kullanılmaktadır. 1960'lı yıllarda *K. pneumoniae*'de penisiline karşı ilk direncin bildirilmesiyle, SHV-1 ile TEM-1 beta-laktamaz genleri keşfedilmiştir. Sefotaksim, seftriakson ve seftazidim gibi 3. kuşak sefalosporinlerin yanı sıra monobaktamlara da direnç ile ilişkili olan GSBL'ler ise, *K. pneumoniae*'de ilk olarak 1983 yılında Almanya'da görülmüş ve SHV-2 geni tanımlanmıştır (32). Kısa süre sonra başka bir plazmid aracılı GSBL geni olan TEM-3 Fransa'da bulunmuştur (33). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ilk olarak plazmid aracılı SHV-1, TEM-1 ve TEM-2 genlerdeki mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir (34,35). *Klebsiella pneumoniae*'de TEM ve SHV genleriyle ilişkili olmayan birçok GSBL geni tespit edilmiştir. Bunlardan en yaygın olanı CTX-M genidir. Bauernfeind ve ark. 1989'da AmpC tipi beta-laktamazlardan plazmid aracılı CMY-1 genini bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlamışlardır (36). 2000'li yıllara doğru GSBL üreten *K. pneumoniae* hastane kaynaklı enfeksiyonların ana sorumlusu haline gelmiştir (30).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler ön planda yer almaktadır (14). Fakat 2013 yılında Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC)'ne bildirilen 9.000 karbapenem dirençli *Enterobacterales* izolatının %80'i *K. pneumoniae*'dir. Karbapenem direnci esas olarak karbapenemaz enzimi üretimi, atım pompasının yukarı regülasyonu ve porin kaybından kaynaklanmaktadır (22).

Kolistin, hücre membranına etkili bir antibiyotiktir ve hücreyi lizise uğratarak antimikrobiyal aktivitesini göstermektedir (37). 1980 ve 2000'li yıllar arasında kullanımının kısıtlanması nedeniyle *K. pneumoniae*'de kolistin direnci nispeten yakın tarihli bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolistin, 2000'li yılların başında ÇİD *K. pneumoniae*'de kullanılabilecek son tercih antibiyotik haline gelmiştir. İlk olarak 2004 yılında Yunanistan'da bir ÇİD *K. pneumoniae* izolatında kolistin direnci tespit edilmiştir (38). Kolistin direncinin esas sebebi kromozomal modifiye gen

düzenleyicilerinin lipit A kısmında değişiklere yol açması veya ilacın ana hedefi olan LPS'nin tamamen kaybıdır. Kolistin direnci aynı zamanda plazmid aracılı da olabilmektedir. *Enterobacterales*'te plazmid aracılı dirençten sorumlu mcr-1 geni ilk olarak Çin'de tanımlanmıştır (39).

Çoklu ilaç dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında kullanılan diğer bir antibiyotik beta-laktam ve beta-laktamaz inhibitör kombinasyonundan oluşan seftazidim-avibaktam (CZA)'dır (40,41). Seftazidim-avibaktam, sınıf A ve D karbapenemazlara etkili olup, sınıf B'ye karşı etkisizdir. Seftazidim-avibaktam direnci ilk olarak bu antibiyotikle tedavi almayan bir hastanın KPC üreten bir *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir (42). Daha sonra klinik kullanıma bağlı olarak CZA dirençli izolatlar tespit edilmiştir. Özellikle KPC-3 geni olmak üzere gen mutasyonları, yukarı regüle edilen akış pompaları ve porin mutasyonlarına bağlı CZA direnci görülebilmektedir (43).

2.3. *Escherichia coli*

2.3.1. Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinin *Escherichieae* soyunda yer alan *Escherichia* cinsi bakterilerden *Escherichia coli* türü klinik laboratuvarlarda en sık rastlanan etkenlerin başında gelmektedir (20). 1885 yılında Theodor Escherich tarafından ilk kez ishalleri bir çocuk dışkılarından tanımlanmıştır. İnsanların gastrointestinal sisteminde bulunan normal flora üyesidir (44). 1940'lı yıllarda Kauffmann tarafından serotiplendirme yapılarak somatik (O), kapsüller (K) ve kamçı (H) yüzey antijenleri ile patojenik *E. coli* suşlarının tanımlanabileceği bulunmuştur (45).

2.3.2. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Çoğu *E. coli* türü normal florada kommensal olarak yaşamaktadır. Ancak bazı suşlar bakteriyofaj veya plazmidle kodlanan enterotoksinler veya invazyon faktörleri ile patojenik hale gelmektedir (46). *Escherichia coli*'nin yaptığı enfeksiyonlar genellikle kişinin kendi florasından kaynaklanmaktadır. Patojenik *E. coli* suşları en sık üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olmaktadır. Üropatojenik *E. coli* suşlarında K antijeni ve P pilusu bulunmaktadır. Gram negatif primer bakteriyemiden sorumlu

başlıca etkindir. Ayrıca üriner sistem veya intestinal sistem kaynaklı *E. coli* enfeksiyonları sekonder bakteriyemiler de yapabilmektedir. Özellikle K1 kapsül üreten suşlar yenidoğan sepsisi ve menenjitli olgulardan yüksek oranda izole edilmektedir (47).

Escherichia coli'ye bağlı intestinal sistem hastalıkları genellikle kontamine yiyeceklerin veya suların fekal-oral alınmasıyla bulaşmaktadır (48). Shiga-toksin üreten *E. coli* (STEC) *Shigella dysenteriae* tarafından üretilenlere benzer olarak Shiga benzeri toksinler üretir ve hafif ya da şiddetli kanlı ishale sebep olmaktadır. İnsanlarda çok fazla sayıda STEC serotipi izole edilmesine karşın çok azı hastalık yapmaktadır. Özellikle enterohemorajik *E. coli* (EHEC) (STEC serotip O157:H7) kanlı ishalin yanında hayatı tehdit edici bir komplikasyon olarak hemolitik üremik sendrom (HÜS) yapabilmektedir (49). Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), küçük çocuklarda ishalin önemli bir etkeni olmakla beraber turist ishalinin de sık nedenidir (50). Diğer intestinal sistem enfeksiyon etkenleri ise Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC), Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz adheran *E. coli* (DAEC)'den oluşmaktadır (48).

2.3.3. Virülans Faktörleri

Bakteri kapsülü ve LPS önemli virülans faktörlerindendir. Kapsül fagositoza ve kompleman aracılı bakterisidal etkiye karşı konakçı immun sisteminden bakteriyi korumaktadır (51). Adezinler konakçı ve bakteri hücre sinyal yollarını doğrudan tetikleyerek, bakteriyel ürünlerin konağa girmesini ve kolonizasyonu kolaylaştıran moleküllerdir. Adezin molekülleri fimbrial adezinler, afimbrial adezinler ve dış membran proteinleri gibi çok çeşitli olarak tanımlanmıştır. Adezin olarak görev yapan dış membran proteinleri ayrıca patojenik *E. coli* suşlarında biyofilm oluşumunu da sağlamaktadır (52). Enterobaktin, aerobaktin gibi demir bağlayan sideroforlar, Tip III sekresyon sistemi, flajella, hemolizin, ekzotoksinler, oligopeptid toksinler, AB toksinleri, enterotoksinler gibi toksinleri virülansda rol oynamaktadır (53).

2.3.4. Laboratuvar Tanısı

Escherichia coli; genişliği 0,4-0,7 µm ile uzunluğu 1,0-3,0 µm değişen, hareketli bir bakteridir. Kanlı agarda hemoliz yapar, ayrıca Eosin Methylene Blue (EMB) agarda metalik refle oluşturmada tanımlamada ön fikir vermektedir. Laktoz fermantasyonuna bağlı MacConkey agarda pembe renkli koloniler meydana getirmektedir (20).

İndol pozitif, metil red pozitif, katalaz pozitif, lizin dekarboksilaz pozitif, mannitol fermentasyonu pozitif ve glikozdan gaz oluşturmaktadır. Voges-Proskauer negatif, sitrat negatif, üreaz negatiftir ve hidrojen sülfür üretmez. Çoğu suşu beta glukuronidaz pozitif ve 4-metilumbelliferil-beta-D-glukuronid (MUG)'i substrat olarak kullanabilmektedir. Spot indol ve MUG testleri hızlı tanımlanmasında yardımcı olmaktadır (47). *Escherichia coli* O157:H7 serotipi sorbitol negatif olması ile diğer *E. coli* serotiplerinden ayrılmaktadır, bunun için sorbitollü MacConkey agar kullanılmaktadır (20).

2.3.5. Tedavisi ve Antibiyotik Direnci

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlardan *E. coli* sıklıkla izole edilmektedir. Neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde aminoglikozidler, florokinolonlar ve beta-laktam grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (47). İntestinal enfeksiyonları için destekleyici tedaviler yeterli olmakla birlikte şiddetli ise florokinolonlar veya sefalosporinler tercih edilmektedir. Ancak HÜS gelişebileceği için EHEC enfeksiyonlarında antibiyotiklerin kullanılması önerilmemektedir (54).

Beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda özellikle beta-laktamaz enzimlerinin üretimine bağlı olarak direnç geliştiği gözlenmiştir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar *E. coli*'de baskın olarak üretilen beta-laktamazlardır. 1980'li yıllarda TEM ve SHV tipi GSBL'ler baskınken, 2000'li yıllardan itibaren CTX-M tipi dünya çapında yaygınlaşmaya başlamıştır. İlk GSBL üreten *E. coli* 1998 yılında İrlanda'da tespit edilmiş ve izole edildiği hastanın çoklu antibiyotik kullanım öyküsü olduğu bildirilmiştir (55). AmpC genleri plazmid aracılığı ile aktarılmaktadır ve *E. coli*'de düşük düzey de olsa AmpC tipi beta-laktamaz üretimi saptanmaya başlanmıştır. *Escherichia coli* izolatlarında GSBL ve

AmpC tipi beta-laktamaz sıklığının artışıyla tedavide karbapenemler daha fazla tercih edilir olmuştur. Son yıllarda beta-laktamlara, florokinolonlara, aminoglikozidlere karşı artan direnç nedeniyle polimiksinlerin ve karbapenemlerin kullanılmaya başlanması bu iki antibiyotik grubuna karşı da direnç görülmesine yol açmıştır (56,57).

2.4. Beta-laktam Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler, yapısında bir azot, üç karbon olmak üzere toplam 4 atomlu heterosiklik beta-laktam halkası içermektedirler. Beta-laktam antibiyotikler penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta-laktamaz inhibitörleri olmak üzere beş gruba ayrılırlar. Monobaktamlar hariç bisiklik yapı gösterir ve beta-laktam halkası beş veya altı atomlu ikinci bir halkaya birleşir. Monobaktamlarda ise beta-laktam halkası tek başına bulunur. Beta-laktamaz inhibitörlerinin (sulbaktam hariç) antibakteriyel etkinlikleri zayıf veya hiç yoktur, genellikle bu grup bir beta-laktam antibiyotikle kombine olarak kullanılmaktadır (58).

2.4.1. Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Bakterilerin hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan peptidoglikan, N-asetil glukozamin, N-asetil muramik asit gibi karbonhidratlar ile L-alanin, D-alanin, D-glutamik asit gibi peptidlerden oluşmaktadır. Hücre zarı tarafından yapılan PBP'ler peptidoglikan yapımının son basamağı olan transpeptidasyonda görev alır. Beta-laktam antibiyotikler bakterisel etkilidirler ve PBP'lere bağlanarak transpeptidasyonu engelleyerek hücre duvarı sentezini inhibe ederler (59).

2.4.2. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç temel olarak üç mekanizma ile oluşmaktadır. Bunlar; PBP'lerde oluşan değişim, beta-laktam moleküllerinin dış membrandan atım pompaları yoluyla atılması ve antibiyotiği hidrolize eden beta-laktamaz enzimlerinin üretimidir (60).

Penisilin bağlayıcı proteinler düşük ve yüksek moleküler ağırlıklı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Yüksek moleküler ağırlığa sahip olanlar A ve B sınıfı

enzimler olmak üzere ikiye ayrılmıştır. A sınıfı beta-laktam duyarlı olmayan transglikozilaz ve beta-laktam duyarlı transpeptidaz içeren iki işlevli enzimlerdir. B sınıfı ise yalnızca transpeptidaz enzimi içerir. Düşük moleküler ağırlığa sahip PBP'ler beta-laktam direncinde rol oynamazlar. Penisilin bağlayıcı proteinlerin yeni bir enzim edinmesi, endojen PBP mutasyonu veya PBP geninin yukarı regülasyonu beta-laktam antibiyotik direncine yol açmaktadır (61).

Dışa atım pompalarında mutasyon oluşan suşlarda antibiyotik direncinin sebepleri, dışa atım pompasında yer alan proteinin artmış ekspresyonu veya antibiyotiğin daha güçlü atımını sağlayan aminoasit değişikliği ile olabilmektedir (20). *Enterobacteriales*'te Acr sistemleri ÇİD ile ilişkili dışa atım pompasıdır. Ayrıca Gram negatif organizmalarda en önemli dışa atım pompa sistemi olan RND (resistance nodulation division), iç zardaki taşıyıcı protein (AcrB), yardımcı protein (AcrA) ve dış zar proteini (OMP) kanalı olmak üzere üç bölümden oluşur. Beta-laktam antibiyotikler hücre içine geçebilmek için OMP'leri kullanır, bu porinlerde herhangi bir yapısal değişiklik beta-laktamların girişini engelleyerek dirence yol açmaktadır (62).

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin en yaygın mekanizması beta-laktamaz enzimlerinin üretilmesidir. Bu enzimler Gram negatif bakterilerde hücre duvarında yer alan dış zar ile hücre zarı arasındaki periplazmik boşlukta bulunurlar. Moleküler yöntemlerle beta-laktamaz kodlayan genler ve aminoasitler belirlenmiştir. Enzimin önemli bir bölgesindeki bir veya daha fazla aminoasitte mutasyon oluşumu beta-laktam antibiyotiklere daha hızlı direnç gelişmesine yol açabilir. Ayrıca beta-laktamaz genleri plazmid veya transpozonlar aracılığıyla bakteriden bakteriye aktarılabilir (20). Bu genlerin yayılmasındaki potansiyel tehlike yalnızca beta-laktam antibiyotiklere karşı değil aminoglikozidler, makrolidler gibi diğer antibiyotik sınıflarına da direnci içeren ÇİD suşların oluşumuna neden olan integron gen kasetlerinin içinde beta-laktamaz genlerinin de yer almasıdır (63).

2.5. Beta-laktamazların Sınıflandırılması

Günümüze kadar çok çeşitli beta-laktamaz genleri tanımlanmıştır ve bu karmaşık enzimleri sınıflandırma şemaları geliştirilmiştir. Richmond ve Sykes tarafından erken bir sınıflandırma oluşturulmuş, ancak çeşitliliğe karşı bu

sınıflandırma yetersiz kalmıştır (64). Ambler tarafından moleküler yapıya göre bir sınıflandırma oluşturulmuş, bu sınıflandırmada aminoasit dizilerine göre beta-laktamazlar dört gruba (A, B, C, D) ayrılmıştır. Grup A, C ve D serin beta-laktamazlar; Grup B ise MBL'dir (65). Bush-Jacoby-Medeiros substrat ve inhibitörleri içinde barındıran işlevsel yapıya, moleküler özellikleri de birleştirerek bir sınıflandırma geliştirmiştir (66). Son olarak Bush ve Jacoby, Ambler sınıflandırmasıyla kıyaslama yaparak, yapısal ve işlevsel sınıflandırmalarla düzenlenmiş güncel bir sınıflandırma geliştirmişlerdir. Bush-Jacoby'nin bu güncel sınıflandırmasına göre beta-laktamazlar dört sınıfa (Grup 1, 2, 3, 4) ayrılmıştır (Tablo 2.1) (67).

Tablo 2.1. Bush-Jacoby Beta-laktamaz Sınıflandırmasının Ambler Sınıflandırmasıyla Karşılaştırılması

Bush-Jacoby	Ambler Sınıf	Enzimler	Aktif Bölge	Enzim İnhibitörleri	Bulunduğu Bakteriler
Grup 1 Sefalosporinazlar	C	AmpC, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1	Serin	FBA, DPA, KL	<i>Enterobacterales</i> <i>Acinetobacter</i> spp.
Grup 1e Sefalosporinazlar	C	GC1, CMY-37	Serin	*	<i>Enterobacterales</i>
Grup 2a Penisilinazlar	A	PC1	Serin	TZ ve KV	<i>S. aureus</i>
Grup 2b Penisilinazlar	A	TEM-1, TEM-2, SHV-1	Serin	TZ ve KV	<i>Enterobacterales</i>
Grup 2be GSBL'ler	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M, PER-1	Serin	TZ ve KV	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Kluyvera</i> spp.
Grup 2ber GSBL'ler	A	TEM-50	Serin	*	<i>Enterobacterales</i>
Grup 2d	D	OXA-01, OXA-10	Serin	TZ ve KV**	<i>Enterobacterales</i>
Grup 2de GSBL'ler	D	OXA-11, OXA-15	Serin	TZ ve KV**	<i>P. aeruginosa</i>
Grup 2df Karbapenemazlar	D	OXA-23, OXA-48	Serin	TZ ve KV**	<i>Enterobacterales</i> <i>A. baumannii</i>
Grup 2e GSBL	A	CepA	Serin	KV***	<i>Proteae</i>
Grup 2f Karbapenemazlar	A	KPC-2, SME-1, IMI-1	Serin	TZ ve KV**	<i>Enterobacterales</i>
Grup 3 MBL	B	IMP-1, VIM-2, IND-1, L1	Çinko	EDTA, DPA	<i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>
Grup 4	Dahil değil	Bilinmiyor			

* TZ ve KV inhibe olmaz; ** Değişken; *** Aztreonam ile inhibe olmaz; Beta-laktamaz inhibitörleri: fenil boronik asit (FBA); dipikolinik asit (DPA), kloksasilin (KL); klavulanik asit (KV); tazobaktam (TZ); edilediamintetraasetik asit (EDTA); geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)

2.5.1. Grup 1 Sefalosporinazlar

Ambler sınıflamasında C grubunda yer alan bu enzimler esas olarak birçok *Enterobacterales*'te ve diğer Gram negatif bakterilerin kromozomunda bulunan yapısal ya da indüklenebilir sefalosporinazları içermektedir. AmpC beta-laktamazlar benzilpenisiline göre sefalosporinler üzerinde daha fazla etkinliğe sahiptir ve klavulanik asitle inhibisyona dirençlidirler. Sefoksitin ve sefotetan gibi sefamisinler üzerine de etkilidir. A sınıfında yer alan sefalosporinazlardan farklı olarak aztreonama karşı yüksek afiniteye sahiptirler. Sefoksitine etkisiz, klavulanik asit veya tazobaktamla inhibe olan, sefotaksime dirençli olup seftazidime direnç göstermeyen istisna AmpC enzimleri de olabileceği bilinmelidir. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia marcescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* da dahil olmak üzere birçok organizmada AmpC üretimi düşüktür, ancak amoksisilin, ampisilin, imipenem ve klavulanik asit gibi bazı beta-laktamlarla olan etkileşim yoluyla indüklenebilir. Bu etkileşim sonucunda büyük miktarda AmpC üretimi sonucu karbapenemlere özellikle de ertapeneme direnç görülebilmektedir. 1989'dan beri plazmid aracılı grup 1 enzimleri olan CMY, ACT, DHA, FOX, MIR bilinmektedir ancak bir diğer plazmid aracılı grup 2 enzimlerinden daha az karşılaşılmaktadır. Bu grupta yer alan enzimler içerisinde klinik izolatlardan en sık izole edilen CMY enzimleridir (57,67).

Grup 1'in yeni bir alt grubu olan Grup 1e, aminoasit değişimleri ile (eklenmeler veya çıkarmalar) seftazidime ve diğer oksimino-beta-laktamlara karşı daha yüksek etkinliğe sahip hale gelmiştir. Genişlemiş spektrumlu AmpC beta-laktamazlar olarak adlandırılmışlardır ve *Enterobacter cloacae*'deki GC1'i ve plazmid aracılı CMY-10, CMY-19 ve CMY-37'yi içerirler. *Pseudomonas aeruginosa*'da imipeneme karşı artmış aktiviteye sahip AmpC türü de tanımlanmıştır. Dirençli organizmalar çoğunlukla AmpC yüksek üretimi ile porin mutasyonunun birlikte görüldüğü durumlarda ortaya çıkmaktadır (68).

2.5.2. Grup 2 Serin Beta-laktamazlar

Ambler sınıf A ve D'yi içeren en geniş beta-laktamaz enzim sınıfını oluşturmaktadır. Grup 2 beta-laktamaz enzimlerinin sayısındaki artış GSBL'lerin artışından kaynaklanmaktadır.

Alt grup 2a'da yer alan penisilinazlar sınırlı etkinliğe sahiptir, bu grup Stafilokok ve bazen Enterokoklar dahil olmak üzere Gram pozitif koklarda bulunmaktadır (69). Bu enzimler penisilinleri, penisilin türevlerini ve nitrosefini iyi hidrolize eder; ancak sefalosporinleri, karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize etmesi zayıftır. Enzimlerin büyük bir kısmı kromozomal kaynaklıdır ancak bazı Stafilokokal penisilinazlar plazmid tarafından taşınabilmektedir. Tüm grup 2a enzimleri klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olur (20).

Alt grup 2b'de en yaygın plazmid aracılı beta-laktamazlar olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-2 yer alır (70,71). Bu gruptaki enzimler penisilinleri, sefaloridin ve sefalotin gibi 1. kuşak sefalosporinleri iyi hidrolize eder, klavulanik asit ve tazobaktamla inhibe olurlar (20). Alt grup 2be'de GSBL'ler yer alır. Bu gruptakiler alt grup 2b'dekiler gibi penisilinlere ve sefalosporinlere karşı etkinliğini korur, ayrıca sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi bir veya birkaç oksimino-beta-laktamları hidrolize ederler. Bu grupta yer alan GSBL'lerin, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'deki aminoasit değişimleri ile substrat etkinliği genişlemiştir (35). TEM ve SHV ile ilişkili olduğu gösterilmiş olan CTX-M enzimleri GSBL grubuna dahil olmuştur. CTX-M enzimlerinin çoğu sefotaksimi seftazidime göre daha iyi hidrolize eder, ayrıca birçoğu sefepimi de iyi hidrolize eder. CTX-M tazobaktam tarafından güçlü, klavulanik asit tarafından nispeten zayıf da olsa inhibe edilir. Ayrıca bu grupta TEM, SHV ve CTX-M ile ilişkili olmayan BEL-1, BES-1 SFO-1, TLA-1, TLA-2, PER ve VEB gibi yaygın olmayan GSBL'ler de yer almaktadır (72,73). Alt grup 2br'de yer alan enzimler, grup 2b özelliklerini korurken farklı olarak klavulanik asit ve ilişkili beta-laktamaz inhibitörlerine karşı direnç kazanmış GSBL'lerdir. Bazı TEM ve SHV enzimleri bu grupta tanımlanmış olsa da şu ana kadar hiçbir CTX-M enzimi bu grupta tanımlanmamıştır (20). Alt grup 2ber'de klavulanik asite kısmen dirençli TEM enzimleri yer almaktadır. Bu gruptakiler CMT (kompleks mutant TEM) beta-laktamazlar olarak da bilinmektedir (74,75).

Alt grup 2c penisilinazlar karbenisilin veya tikarsilini benzilpenisilin kadar iyi hidrolize etse de; kloksasilin veya oksasilini daha zayıf hidrolize eder. Bu grup klavulanik asit veya tazobaktamla inhibe olur (66). Alt grup 2ce, sefepim ve sefpiroma karşı etkili genişlemiş spektrumlu karbenisilinazı (CARB-10) içerir (67).

Alt grup 2d, Ambler sınıf D'de yer alan enzimleri içerir. Bu grup kloksasilin veya oksasilini penilisilinden daha iyi hidrolize eder, bu nedenle oksasilinaz (OXA) enzimleri olarak bilinmektedir. OXA ile ilişkili enzimler beta-laktamazların ikinci en büyük grubunu oluşturmaktadır (20). Alt grup 2de, oksimino-beta-laktamları içeren fakat karbapenemleri içermeyen genişlemiş spektrumda grup 2d etkinliklerini korumuştur. Bu grupta da OXA enzimleri yer alır. Seftazidim direnci, sefotaksim ve aztreonam direncinden daha belirgindir. Türkiye ve Fransa'da *P. aeruginosa* izolatlarında bu alt gruba üye OXA'lar tanımlanmıştır (76). Alt grup 2df'de, karbapenem hidrolize edebilen OXA enzimleri yer alır. Genellikle kromozomal kaynaklıdır ve en sık *Acinetobacter baumannii*'de görülür. Ancak *Enterobacterales*'te plazmid kaynaklı olan OXA-23 ve OXA-48 tanımlanmıştır. OXA tipi karbapenemazlar karbapenemler için zayıf hidrolize edicidir, ancak kıyaslandığında imipenem (IMP) meropenem (MEM)'den daha iyi hidrolize olur. Bu gruptakiler klavulanik asitle inhibisyona dirençlidir (67).

Alt grup 2e sefalosporinazlar geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder, klavulanik asit veya tazobaktamla inhibe edilir. Bu grup *Proteus spp.*'deki indüklenebilir kromozomal sefalosporinazları içerir. Benzer direnç profiline sahip oldukları için AmpC veya GSBL enzimleri ile karıştırılabilmektedir. Aztreonam için zayıf etkinlik göstermeleriyle AmpC'den ayrılır (20).

Alt grup 2f, Ambler sınıf A serin karbapenemazları içerir. Karbapenemler bu grup için ayırt edici substratlardır. Ayrıca tazobaktam, klavulanik aside göre bu grubu daha iyi inhibe eder. Bu grupta yer alan SME, IMI-1 ve NMC-1 kromozomal kaynaklıdır. Ancak KPC ve GES gibi plazmid kaynaklı enzimler de yer alır (20).

2.5.3. Grup 3 Metallo-beta-laktamazlar

Metallo-beta-laktamazlar aktif bölgelerinde çinko atomu bulunduran genellikle ikinci veya üçüncü bir beta-laktamazla beraber üretilen enzimlerdir. Serin beta-laktamazlar gibi karbapenemleri hidrolize etme yetenekleri vardır. Metallo-beta-laktamazlarda serin beta-laktamazlardan farklı olarak monobaktamlara karşı etkinlik zayıftır, klavulanik asit veya tazobaktamla inhibe olmazlar. EDTA, DPA gibi metal iyon şelatörleriyle inhibe olurlar. Alt grup 3a, çoğunlukla non-fermentatif bakterilerde olmak üzere *Enterobacterales*'te de bulunabilen plazmid kaynaklı

imipenemaz ve VIM (Verona integron-encoded MBL) enzimlerini içermektedir. Bu grup, penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize eder. Alt grup 3b, grup 3a'dan farklı olarak yalnızca karbapenemleri hidrolize eder. Bu sebeple nitrosefin gibi bir sefalosporin kullanılarak tanımlanamaz (9).

2.5.4. Grup 4 Beta-laktamazlar

1995 yılında Bush-Jacoby-Medeiros sınıflamasında yer alan bu grup, 2010 yılında Bush-Jacoby güncellemesine dahil edilmemiştir. Bu gruptaki enzimler tam olarak tanımlanamadığı için kategorize edilmemiştir (20).

2.6. Karbapenemler

Karbapenemler en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerdir. Diğer beta-laktamlardan farklı olarak 6. pozisyonunda bir hidroksietil yan zincire sahiptir. Hidroksietil yan zincirinin farklılığı beta-laktamazlara karşı dayanıklılık sağlar. Gram negatif ve pozitif bakterilerin PBP'lerine bağlanarak hücre lizisine neden olur. Plazmid veya kromozomal ilişkili beta-laktamazlara sahip birçok Gram negatif bakteriye etkilidir. *Enterococcus faecalis* dahil Gram pozitif koklara karşı etkilidir; ancak *Enterococcus faecium* ve metisilin dirençli stafilokoklara karşı etkili değildir. Gram negatif aerobik basillerden *Enterobacterales*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarının çoğuna, *Haemophilus influenzae*, *Bacteroides fragilis* gibi anaeroblara ve *Mycobacterium avium intracellulare* suşlarına karşı etkilidirler. İmipenem, meropenem ve ertapenemin klinik kullanımları mevcuttur. Diğer karbapenemler ise; biapenem, doripenem, faropenem ve panipenemdir (77).

2.6.1. Karbapenem Dirençli *Enterobacterales*

Enterobacterales'te, karbapenem antibiyotiklerden (ertapenem, meropenem, doripenem veya imipenem) en az birine dirençli veya karbapenem antibiyotiklere dirençli hale getiren bir enzim ürettiği saptanmış izolatlar karbapenem dirençli *Enterobacterales* (KDE) olarak tanımlanmaktadır. *Proteus* spp., *Morganella* spp. ve *Providencia* spp. gibi bazı *Enterobacterales* cinsleri imipeneme yapısal olarak yüksek minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) gösterirler. Bu izolatların KDE

olup olmadığına meropenem, doripenem ve ertapenem sonuçlarına bakılarak karar verilmelidir (78).

2.6.2. Karbapenem Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Enterobacterales'te karbapenem direnci porin kaybı nedeniyle bakteri dış zarın geçirgenliğinde azalma, antibiyotik dışa atım pompasındaki değişiklikler, AmpC veya GSBL üretimi gibi direnç mekanizmalarının bir arada olmasıyla veya karbapenemaz enzimi üretimi gibi nedenlerle görülmektedir (14).

2.6.2.1. Karbapenemazlar

Karbapenemaz enzimlerinin üretilmesiyle karbapenem hidrolize olur. Bu da bakteri hücre duvarındaki porin kanallarının yapısının değişmesine ve ilacın geçirgenliğinin azalması ile bakteriyel direncin görülmesine neden olur (14). Ambler moleküler sınıflamasına göre A, B ve D'de yer alanlar karbapenemaz aktivitesine sahiptir. Ancak Ambler sınıf C'de yer alan AmpC enzimleri porin kaybı mutasyonlarıyla birlikte tespit edilirse karbapenem direncine yol açabilmektedir. Tablo 2.2'de karbapenemaz aktivitesine sahip beta-laktamazlar gösterilmiştir.

Tablo 2.2. Karbapenemaz Aktivitesi Olan Beta-laktamazlar

Ambler Sınıf	Enzimin Saptandığı Gram Negatif Bakteriler	Örnek Enzimler
A	<i>Enterobacterales</i>	KPC, SME, NMC-A, IMI, PER, GES
B	<i>Enterobacterales</i> <i>P. aeruginosa</i> <i>A. baumannii</i>	IMP, VIM, NDM, SIM, GIM
D	<i>Enterobacterales</i> <i>A. baumannii</i>	OXA, PSE

2.6.3.1. Ambler Sınıf A Karbapenemazlar

Aktif bölgelerinde bulunan aminoasite göre serin karbapenemazlar olarak da bilinirler. Karbapenemleri, aztreonamı, penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize ederler. Bu sınıfta yer alanlar NMC (not metallo-enzyme carbapenemase), IMI (İmipenem hidrolize edici beta-laktamaz), SME (*Serratia marcescens* enzimi), KPC (*K. pneumoniae* karbapenemaz), GES (Guiana extended spectrum) enzimleridir. Bunlardan SME, NMC, IMI kromozomal; KPC ve GES plazmid kaynaklıdır (79).

2.6.3.2. Ambler Sınıf B Karbapenemazlar

Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurmasıyla MBL olarak adlandırılırlar. Karbapenemler, çoğu sefalosporinler ve penisilinleri hidrolize ederler, ancak aztreonama karşı etkisizdirler. En yaygın MBL'ler integronlar içinde yer alan NDM (New Delhi MBL), VIM ve IMP enzimleridir. Bu genler plazmidler veya transpozonlarla kolayca yayılabilir (9).

2.6.3.3. Ambler Sınıf D Karbapenemazlar

Aktif bölgelerinde serin içeren bu grup, oksasilini ve kloksasilini hidrolize edebilir, oksasilinazlar olarak da bilinmektedir. Sınıf D karbapenemazlar seftazidim, sefotaksim ve aztreonama duyarlı olabilirler. Çoğu OXA tipi karbapenemazlar imipenem ve meropenem karşı zayıf etkinlik gösterir (80).

2.7. Dünyada ve Ülkemizdeki *Enterobacterales* İzolatlarının Karbapenem Direnç Epidemiyolojisi

1990'lı yılların başından itibaren karbapenemlere karşı direnç artmıştır ve değişik coğrafyalarda yayılımının giderek arttığı bildirilmiştir (81). 1993 yılında *Enterobacter cloacae* izolatından tespit edilen NmcA, *Enterobacterales*'te ilk tanımlanan karbapenemaz olmuştur (82). O zamandan beri tüm dünyada karbapenemaz genlerinin yayılımı devam etmiştir. KPC ilk kez bir *K. pneumoniae* klinik izolatından 1996'da Kuzey Carolina'da tespit edilmiş ve Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde en sık saptanan karbapenemaz olduğu bildirilmiştir. ABD'den sonra ilk KPC 2006 yılında İsrail'de bildirilmiştir. Avrupa'da Akdeniz ülkelerinde özellikle İtalya ve Yunanistan'da KPC'nin en yüksek insidansa sahip olduğu tespit edilmiştir (83). Ülkemizde saptanan ilk KPC, 2012 yılında Romanya'daki bir hastaneden ülkemize sevk edilen bir hastanın trakeal aspirat kültüründen izole edilen KPC-2'dir (84).

NDM ilk kez 2007 yılında Hindistan'a seyahat eden İsviçreli bir hastanın idrar kültüründe üreyen *K. pneumoniae* suşundan izole edilmiş ve aynı hastanın dışkılarından izole edilen *E. coli* suşunda da tespit edilmiştir (85). Metallo-beta-laktamazların insidansı Asya kıtasında yaygındır, ABD ve Kanada'da insidansı

düşüktür. NDM enzimi, ülkemizde ilk defa 2011 yılında İstanbul'daki bir hastanın kan kültüründen izole edilen *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır (86).

OXA-48 enzimi, ilk defa 2001 yılında ülkemizde bir *K. pneumoniae* izolatında bildirilmiştir. Ardından OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatlarıyla hastane ilişkili enfeksiyonlar görülmeye devam etmiştir. Sadece Avrupa'da değil, Orta Doğu, Afrika, Asya ve Güney Amerika'da da OXA-48 ve pek çok türü bildirilmiştir. OXA-48'e bağlı karbapenem direnci ABD'de nadirken Avrupa'da özellikle Akdeniz ülkelerinde oldukça yaygındır (87).

Antimikrobiyal Test Yönetimi ve Sürveyansı (ATLAS), Asya/Pasifik, Avrupa, Latin Amerika, Orta Doğu/Afrika ve Kuzey Amerika bölgelerindeki ülkelerdeki çeşitli klinik izolatların çeşitli antimikrobiyallere karşı in-vitro duyarlılığını yıllık olarak izleyen uluslararası sürveyans programıdır. Bu programa 2018-2022 yılları arasında 49 ülkedeki 157 merkez katılmış ve toplamda 79.214 *Enterobacterales* izolatu incelenmiştir. Verilere göre KDE izolatlarının oranı 2018'de %4,7 iken, 2022'de %12,9'a çıkmıştır (88). Farklı karbapenemaz pozitif *Enterobacterales* (KPE) izolatlarının coğrafi yayılımları farklılık göstermektedir. Çeşitli karbapenemazların en yüksek prevalansa sahip olduğu bilinen ülkeler NDM için Hindistan; KPC için ABD, İsrail, Yunanistan ve İtalya; OXA-48 için ise Türkiye, Orta Doğu ve Kuzey Afrika'dır (89,90).

Kasım 2023'te Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC) ve DSÖ Avrupa Bölge Ofisi tarafından ortak olarak Avrupa'da antimikrobiyal direnç sürveyansı yayınlanmıştır. Raporda sunulan sonuçlar, Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı (CAESAR) ağına ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı (EARS-Net) ağına bildirilen invaziv izolatlardan elde edilen antimikrobiyal direnç verilerine dayanmaktadır. Bu rapora göre 2021 yılı verilerine bakıldığında, invaziv enfeksiyonlardan elde edilen *E. coli* izolatlarında karbapenem direnci %0 ile %1,1 arasında tespit edilmiş olup, 44 ülkeden 8'inde (%18) (Belarus, Kıbrıs, Gürcistan, Yunanistan, Rusya, Sırbistan, Türkiye ve Ukrayna) %1 veya üzerinde bildirilmiştir. Bu rapora göre 2021 yılı verilerine bakıldığında, invaziv enfeksiyonlardan izole edilen *K. pneumoniae*'lerde karbapenem direnci %0 ile %73,7 arasında büyük değişkenlik göstermekte olup, 45 ülkenin 8'inde (%18) %50 veya

üzerinde bildirilmiştir (Belarus, Gürcistan, Yunanistan, Moldova, Romanya, Rusya, Sırbistan ve Ukrayna). 2017'den 2021'e kadar düzenli veri sağlayan tüm laboratuvarlarda *K. pneumoniae* için karbapenemlere dirençli izolatlarda artış görülmüştür. Beklendiği gibi, karbapenem direnci *K. pneumoniae*'de *E. coli*'ye göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu rapora göre özellikle Bosna-Hersek, Sırbistan ve Türkiye'de *K. pneumoniae* izolatlarında üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı dirençte artış görüldüğü bildirilmiştir. Bu sörveyans programında 2021 yılı Türkiye verilerine göre incelenen *E. coli* izolatlarının %4,7'sinde, *K. pneumoniae* izolatlarının ise %49,1'inde karbapenem direnci tespit edilmiştir. 2017-2021 yıllarında Türkiye'den gönderilen *Enterobacterales* izolat sayısı arttığı gibi yıllar içerisinde tespit edilen KDE izolatlarının sayısı da artmıştır (91).

CAESAR ağına 17 ülkeden ve EARS-Net'e 30 ülkeden bildirilen invaziv izolatlardan elde edilen 2022 yılına ait antimikrobiyal direnç verilerinden elde edilen sonuçlara göre *E. coli*'de karbapenem direnci nadir görülmeye devam etmiştir, ancak veri sağlayan ülkelerin neredeyse üçte birinde *K. pneumoniae*'de karbapenem direnci %10'un üzerinde saptanmıştır. 2018-2022 yıllarına ait EARS-Net verilerine göre antimikrobiyal direnç oranlarındaki en büyük artış karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'de görülmüştür. Ayrıca karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu kan dolaşımı enfeksiyonlarının görülme sıklığında, 2019'a göre 2022 yılında önemli ölçüde artış (%49,7) tespit edilmiştir (92).

EURGen-Net tarafından yürütölen çalışmada en yüksek karbapenem direnç oranları Güney ve Doğu Avrupa'da gözlemlenmiştir. 2022 yılına ait EURGen-Net sonuçlarına göre 2010-2018 arasında KPE'nin yayılımının arttığı görölmüştür (93).

Kasım 2013 ile Nisan 2014 tarihleri arasında 36 ülkeden 455 hastanenin dahil olduğu EuSCAPE araştırmasında toplamda 2.301 adet *K. pneumoniae* ve 402 adet *E. coli* izolatı incelenmiştir. Bunlardan karbapeneme dirençli 1.397 izolatın 1.203'ünün (%86) *K. pneumoniae*, 194'ünün (%14) *E. coli* olduğu görölmüştür. Karbapenem dirençli tüm izolatlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile KPC, NDM, OXA-48 ve VIM tipi genlerin varlığı araştırılmıştır. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının 850'sinde (%71) ve *E. coli* izolatlarının 77'sinde (%40) PZR ile gen

varlığı doğrulanmıştır. İnsidansın yüksek olduğu ülkeler arasında Yunanistan, İtalya, Karadağ, İspanya ve Sırbistan yer almıştır. Toplam 927 adet KPE izolatının 393'ünde (%42) saptanan KPC en sık tespit edilen karbapenemaz türü olmuştur, 353'ünde ise (%38) OXA-48 tespit edilmiş olup ikinci sırada yer almıştır. *Klebsiella pneumoniae*'de en sık tespit edilen karbapenemazlar KPC enzimleri olmuş [850 izolatın 379'u (%45)], bunu OXA-48 (310 izolat, %37), NDM (93 izolat, %11) ve VIM (68 izolat, %8) takip etmiştir. *Escherichia coli*'de en sık tespit edilen karbapenemazlar OXA-48 enzimleri [77 izolatın 43'ü (56)] olmuş, bunu NDM (20 izolat, %26) ve KPC (14 izolat, %18) izlemiştir. OXA-48 enzimleri Türkiye'de yaygın olup, karbapeneme dirençli 124 *K. pneumoniae* izolatının 98'inde (%79) ve 22 *E. coli* izolatının 19'unda (%86) tespit edilmiştir (89).

2010 yılında hastanelerdeki KPE'nin yayılma derecesini belirlemek için epidemiyolojik evreleme sistemi geliştirilmiştir. Bu sistem KPE'nin ulusal yayılımını tanımlayan hiçbir vaka görülmemesinden (evre 0), endemik duruma geçmesine (evre 5) kadar ardışık evrelerden oluşmaktadır. 2018 yılında EURGen-Net'e bağlı KPE epidemiyolojik evre araştırılmasında 37 katılımcı ülkenin tamamı KPE vakaları bildirmekle beraber genel olarak, 11 ülke 2015 yılına göre daha yüksek bir KPE epidemiyolojik evresi bildirmiştir. 2018'de bölgesel veya bölgeler arası yayılıma sahip ülke sayısı 16'ya yükselmiştir. 2015'te olduğu gibi 2018'de de ülkemiz endemik durum bildiren ülkeler (Yunanistan, İtalya, Malta ve Türkiye) arasında yer almıştır (90).

2011 yılından itibaren ülkemizde kan kültürü ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin de yer aldığı bazı bakterilerin antimikrobiyal direnç oranları Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) tarafından incelenmektedir. 2016 yılından itibaren UAMDSS, CAESAR ağına dahil edilmiştir. UAMDSS 2016 yılı verilerine göre karbapenem direnci *K. pneumoniae*'de %48,9 ve *E. coli*'de %8,2 oranlarında tespit edilmiştir (94).

2.8. *Enterobacterales* Takımında Karbapenemaz Üretimini Saptama Yöntemleri

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi, KDE'lerin karbapenemaz üretiminin tespiti için taramayı önermektedir (95). Ayrıca KPE izolatlarının karbapenem MİK değerlerinin klinik sınır değerlerin üzerinde olabileceği gibi altında da olabileceği bilinmelidir. Bu yüzden EUCAST epidemiyolojik eşik değerlerinden (ECOFF) yola çıkarak tarama sınır değerleri belirlemiştir (10).

2.8.1. Karbapenemaz Üretimini Tarama Yöntemleri

Karbapenemaz üretimini taramak için MEM veya ertapenem kullanılabilir. Karbapenemaz tespitinde duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek karbapenem meropenemdir. Ertapenemin duyarlılığı yüksek, ancak özgüllüğü düşüktür. Çünkü özellikle *Enterobacter* spp.'de belirgin olan porin mutasyonu ile GSBL veya AmpC enzimleri varlığında ertapenem hidrolize olur ve karbapenemazları olmasa da bu izolatlar ertapeneme dirençli olabilir (96). Karbapenemaz üreten *Enterobacterales* için EUCAST'ın belirlediği klinik sınır değerleri ve tarama eşik değerleri Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3. Karbapenemaz Üreten *Enterobacterales* için EUCAST'ın Belirlediği Klinik Sınır Değerleri ve Tarama Eşik Değerleri

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon inhibisyon zon çapı (mm) (10 µg antibiyotik diskleri)	
	Klinik sınır değeri (S/I)	Tarama eşik değeri	Klinik sınır değeri (S/I)	Tarama eşik değeri
Meropenem	≤ 2	> 0,125	≥ 22	< 28 ¹
Ertapenem	≤ 0,5	> 0,125	≥ 25	< 25

S: Duyarlı; I: Yüksek dozda duyarlı

¹ Zon çapı 25-27 mm olan izolatlar piperasilin tazobaktam ve/veya temosilin dirençli ise çalışılmalıdır (Temosilinin özgüllüğü daha iyidir). Meropenem zon çapı <25 mm ise karbapenemaz üretimi açısından muhakkak çalışılmalıdır.

Karbapenemaz üretimini tespit edebilmek için otomatize sistemler, sıvı mikrodilüsyon, disk difüzyon veya gradient difüzyon testi ile elde edilen karbapenem antibiyotik duyarlılık sonuçlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Disk difüzyon yöntemiyle taramada ticari 10 µg karbapenem grubu antibiyotik diskleri (MEM,

ertapenem) kullanılarak inhibisyon zonu çapı mm cinsinden ölçülür. Daha sonra elde edilen inhibisyon zon çapları dikkate alınarak EUCAST tarafından belirlenen eşik değerlere göre yorum yapılır. Uygulaması kolay, düşük maliyetli olduğundan sık tercih edilen bir tarama yöntemidir.

Gradyent difüzyon testiyle taramada ise MİK aralığı 0,002-32 µg/ml olan karbapenem antibiyotiği (ertapenem veya MEM) içeren ticari gradiyent şeriti kullanılır. Üremenin inhibe olduğu yerde şerit üzerindeki değer ölçülür ve MİK belirlenir. Daha sonra elde edilen MİK ile EUCAST tarafından belirlenen eşik değerlere göre yorum yapılır.

Otomatize sistemle karbapenem antibiyotiğinin (ertapenem veya MEM) dilüsyonları kullanılarak MİK belirlenir. Ancak otomatize sistemlerde test edilen antibiyotiğin orantısız artan dilüsyonları kullanılıyorsa standart yöntemle göre tutarsız sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle otomatize sistemlerle karbapenem duyarlılığı azalmış olarak tespit edilen izolatlarda başka bir tarama yöntemi ile de değerlendirme önerilmektedir (97).

2.8.2. Karbapenemaz Üretimini Doğrulama Yöntemleri

Karbapenemaz tarama testi pozitif olan bir izolatta, karbapenemaz üretiminin tespiti için fenotipik veya genotipik yöntemlerle doğrulama testleri yapmak gerekmektedir (98).

2.8.2.1. Fenotipik Yöntemler

Laboratuvarında uygulanan rutin duyarlılık testleri ile karbapenem duyarlılığında azalma saptanan izolatlara karbapenemaz varlığını gösterebilmek için fenotipik testler uygulanmalıdır (96). Bu testler kombinasyon disk testi, kolorimetrik yöntemler, karbapenem hidrolizini gösteren diğer yöntemler, lateral akım yöntemleri gibi testlerden oluşmaktadır.

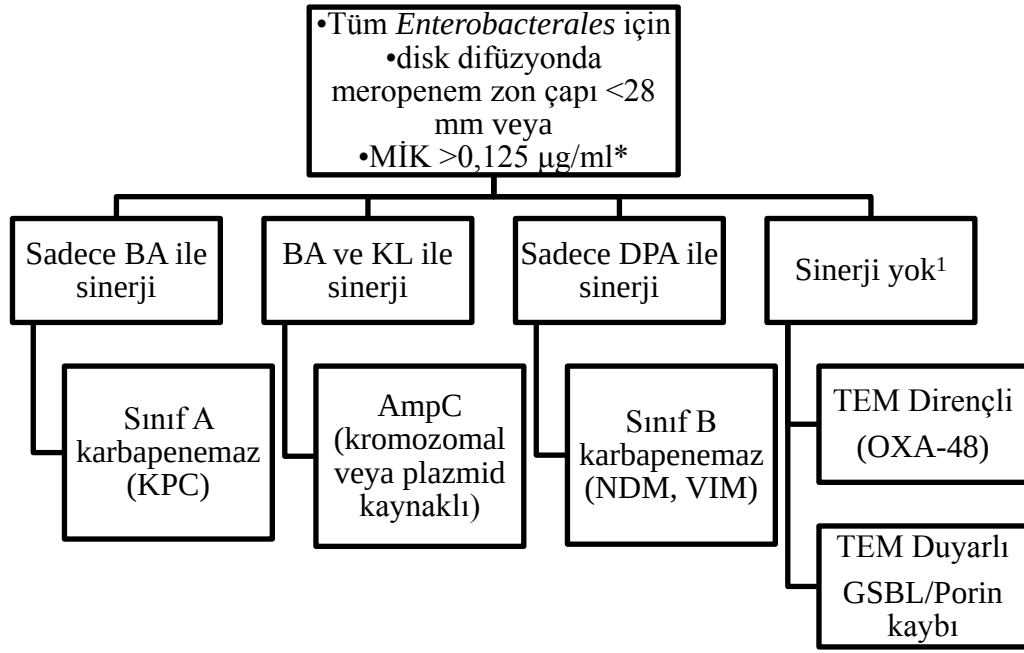
Modifiye Hodge testi (MHT) eskiden *Enterobacteriales*'te karbapenemaz tespitinde yaygın kullanılan bir yöntem olmasına karşın duyarlılığının ve özgüllüğünün düşük olması ve sonuçların yorumunun zor olması sebebiyle artık önerilmemektedir (10). Özellikle NDM üreten suşlarda düşük duyarlılık göstermesi

veya porin mutasyonları yanında GSBL ve/veya AmpC üreten izolatlarda genellikle yanlış pozitiflik göstermesinden dolayı özgüllüğü düşüktür (99).

2.8.2.1.1. Kombinasyon Disk Testi

Kombinasyon disk testinde çeşitli inhibitör ajanlarla kombine edilmiş karbapenem antibiyotik diskleri kullanılmaktadır. İnhibitör ajanla kombine edilen karbapenem antibiyotik diskinin inhibisyon zonu, tek başına karbapenem antibiyotik disk zonu ile karşılaştırılarak kombine disk zon çapında anlamlı artış olup olmadığı değerlendirilmektedir. Karbapenem antibiyotikler ile kombine edilmiş boronik asit ve türevleri (fenil boronik asit (PBA) ve 3-aminofenil boronik asit), dipikolinik asit (DPA), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA), kloksasilin ve temosilin (TEM) başlıca kullanılan inhibitör ajanlardır. Bu ajanlardan boronik asit sınıf A karbapenemazlarla, DPA ve EDTA sınıf B karbapenemazlarla sinerji göstermektedir. OXA-48 benzeri enzimler için spesifik bir inhibitör bulunmamakla beraber OXA-48 enzimine sahip olan suşlarda TEM'e yüksek düzey direnç (MİK >128 mg/L veya zon çapı ≤ 11 mm) görüldüğü için fenotipik belirleyici olarak kullanılması önerilmektedir. Ancak diğer direnç mekanizmaları da TEM için yüksek MİK değerlerine yol açabileceğinden TEM direnci OXA-48'e özgü değildir. Bu yüzden OXA-48 varlığı diğer yöntemlerden biriyle doğrulanmalıdır. Kloksasilin ise AmpC üretimi ve porin kaybı nedeniyle ortaya çıkan karbapenem direncini karbapenemaz üretiminden ayırmada kullanılmaktadır. Çoklu karbapenemaz direnç genlerini belirleyebilmek için hem ticari [KPC, MBL and OXA-48 Confirm Kit (Rosco Diagnostica) ve MASTDISCS® Combi Carba Plus (MAST Diagnostics)] olarak temin edilebilen hem de laboratuvarında geliştirilen kombinasyon disk tanı setleri mevcuttur (10).

Grafik 2.1'de KDT'lerin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması verilmiştir. Yapılan çalışmalar ile valide edilmiş yöntem olması, enzim sınıflandırılmasını sağlaması ve hazır ticari disklerin temin edilebilmesi nedeniyle KDT avantajlı bir yöntemdir. Bununla birlikte sonuçları değerlendirmek için 18 saatlik bir süre gerekmektedir.



Grafik 2.1. Kombinasyon disk testlerinin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması

*Meropenem 25-27 mm ve piperasilin-tazobaktam duyarlı/yüksek dozda duyarlı ise başka teste gerek yoktur.

¹ Bir izolatta birden fazla karbapenemazın bulunması sinerji görülememesine neden olabilir.

2.8.2.1.2. Biyokimyasal (Kolorimetrik) Testler

CarbaNP (Carbapenemase Nordmann-Poirel) testi 2015 yılında CLSI tarafından onaylanan kolorimetrik tabanlı bir testtir. Testin temel prensibi karbapenem antibiyotiğinin hidrolize uğrayarak pH değişimine yol açmasıdır. Sonuçta fenol kırmızısı solüsyonunun rengi kırmızıdan sarıya dönmektedir. Yöntem hızlıdır ancak özel reaktif gerektirmesi ve kullanılan solüsyonların depolama süresi kısıtlılığı gibi dezavantajları da vardır. Bu yöntemde Mueller-Hinton agar (MHA), koyun kanlı agar, trypticase soy agar ve karbapenemaz tarama besiyerlerinin çoğundan elde edilen koloniler kullanılabilir, ancak MacConkey ve Drigalski agardaki koloniler kullanılmamalıdır (100).

Blue-Carba testi ise CarbaNP'nin türevi bir hızlı testtir. Doğrudan test edilecek bakteri kolonisinin imipenemi hidrolize etmesi, pH değişikliği sonucu indikatör olan brom timol mavisinin renginin maviden yeşil/sarıya veya yeşilden sarıya dönmesi ile değerlendirilmektedir. Bu testte de A ve B sınıfı enzimler yüksek

duyarlılıkta saptanırken, OXA-48 saptanmasının düşük duyarlılıkta olduğu bildirilmiştir (101).

Beta-CARBA testi de diğer bir ticari hızlı testtir. Birkaç koloni reaktif ile karıştırılır ve en fazla 30 dakika inkübasyonu beklenir. Rengin sarıdan turuncu, kırmızı veya mora dönmesi pozitifliği göstermektedir. OXA-48 tespitinde diğer testlere göre daha iyi olduğu görülmüştür (102).

2.8.2.1.3. Karbapenem İnaktivasyon Metodu

Karbapenem inaktivasyon metodu ilk olarak 2015 yılında Van der Zwaluw ve ark. tarafından karbapenemaz tespiti için fenotipik doğrulama testi olarak önerilmiştir (12). Bu yöntemde karbapenemaz tespiti yapılacak bakteri suşu besiyeri içinde süspanse edilir ve 10 µg MEM antibiyotiği ile 2 saat 35±2°C’de inkübe edildikten sonra, *E. coli* ATCC 25922 referans suşu ekilmiş besiyerine aktarılır. Antibiyotik inhibisyon zonu çapına göre izolatin karbapenemaz üretilip, üretilmediği yorumu yapılır. Eğer test edilen bakteri karbapenemaz üretiliyorsa, antibiyotik bakteri tarafından etkisiz hale getirilerek inhibisyon zon çapı daralır, karbapenemaz üretilmiyorsa antibiyotik etkisini gösterir, inhibisyon zon çapı genişler. Karbapenem inaktivasyon metodu, kolay uygulanabilmesi, maliyet etkin, yüksek duyarlılık ve özgüllükte olmasıyla karbapenemaz taraması için tercih edilen bir yöntemdir (103). Ancak bazı araştırmacılar testin duyarlılığındaki farklılıkları bildirmişler ve yöntemin standardize edilmesi için ileri çalışmalar yapılarak CIM testi modifiye edilmiştir.

2.8.2.1.3.1. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu

Pierce ve ark. 2017 yılında CIM’in duyarlılığını arttırmak için yöntem standardizasyonuna giderek mCIM testini geliştirmişlerdir (104). Bu yeni yöntemde CIM’den farklı olarak test edilecek bakteri suşu ile meropenem diski inkübasyon süresi 4 saate çıkarılarak, testin duyarlılığı arttırılmıştır. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü 2017 yılında mCIM’i onaylayarak kılavuzlarına eklemişlerdir (15).

2.8.2.1.3.2. EDTA'lı Karbapenem İnaktivasyon Metodu

2018 yılında Sfeir ve ark. tarafından, mCIM MBL'leri ayırt edemediği için B sınıfı enzimleri A ve D sınıfı enzimlerinden ayırt etmek için mCIM yönteminin bir çeşidi olan EDTA inhibisyonunun kullanıldığı eCIM tanımlanmıştır (17). Modifiye karbapenem inaktivasyon metodundan farklı olarak bu yöntemde ek olarak başka bir tüpte antibiyotik ve bakteri süspansiyonu içerisine EDTA ilave edilerek yapılmaktadır. Sonuçlar yorumlanırken hem EDTA ile muamele edilen antibiyotik diski hem de EDTA'sız antibiyotik diski inhibisyon zon çapları karşılaştırılarak karbapenemaz sınıfı belirlenmektedir. EDTA'lı karbapenem inaktivasyon metodu da CLSI tarafından onaylanarak, CLSI kılavuzlarına eklenmiştir (18).

2.8.2.1.4. Karbapenem Hidrolizinin Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi ile Saptanması

Bu yöntemde karbapenem antibiyotiklerle test edilecek izolatın inkübasyonu sonrası hidrolize uğramış karbapenem ürünlerini veya hidrolize olmadan kalan karbapenemlerin kütle spektrumunda karbapenemlere özgül yaptığı grafiklerle karbapenemaz tespiti yapılmaktadır. Aynı gün sonuç vermesiyle avantajlı bir yöntemdir ancak OXA-48 için duyarlılığı düşük bulunmuştur (99). MALDI-TOF MS sistem ayarları karbapenemaz tanımlamasında farklı olduğu için deneyimli personel gerektirir, ayrıca pahalı bir yöntem olması da diğer bir dezavantajdır (105).

2.8.2.1.5. Lateral Akım Yöntemleri

Karbapenemazları tanımlayabilmek için hızlı ve basit bir yöntem olan immünokromatografik lateral akım testleri geliştirilmiştir. Karbapenemaz enzimlerine karşı geliştirilen monoklonal antikorlar ile karbapenemaz saptanması temeline dayanan bu test 15 dakikadan daha kısa sürede sonuç vermektedir (106). Bu yöntemde test edilen bakteride bulunan antijen ile kromatografik kağıtta sabit bulunan antikor birleşerek immun kompleks oluşumuna yol açar. Bu immun kompleksin yaptığı renk değişikliği sonucu karbapenemaz varlığı tespit edilir.

İlk olarak OXA-48 epitoplarının yakalanmasına yönelik oluşturulan lateral akım testleri ilerleyen çalışmalarla NG-Test Carba-5 (NG-Biotech, Guipry, Fransa) gibi ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onaylı diğer karbapenemaz genlerinin de tespit edilebileceği (KPC, NDM, IMP, VIM) şekilde geliştirilmiştir (10).

2.8.2.1.6. Kültür Tabanlı Yöntemler

Karbapenemaz üreten *Enterobacterales* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların önlenmesinde, kontrolünde ve sürveyansında kolonize hastaların hızlı tespiti ve izolasyonu için karbapenemaz taraması gereklidir. Kolonize hastalarda karbapenemaz taraması yapmak için CDC rektal veya perirektal sürüntü örneklerinin alınmasını önermiştir (78). Özellikle kültür bazlı yöntemler bu tarama sistemi için önemli bir yer tutmaktadır.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin sıvı besiyeri zenginleştirme yönteminde karbapenem antibiyotik diski (MEM veya ertapenem) içeren Trypticase soy broth (TSB) besiyeri ile rektal sürüntü örneği süspanse edilir, 24 saatlik inkübasyon sonrası süspansiyondan MacConkey agara kültür ekimi yapılır ve 24 saatlik inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası laktoz pozitif, oksidaz negatif koloniler karbapenemaz üretimi açısından incelemeye alınır (107). Bu yöntemin sınırlaması agarda üreyen izolatın türünü ve antibiyotik duyarlılık durumunu belirlemek için ek testlere ihtiyaç olması ve laktoz negatif karbapenemaz barındırabilen bakterilerin atlanmasıdır.

Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin önerdiği diğer bir kültür tabanlı yöntem olan direkt karbapenem disk yönteminde ise klinik örneklerin ekiminden sonra ekim alanlarına karbapenem diski yerleştirilir. İnkübasyon sonunda zon içinde üreyen dirençli koloniler karbapenemaz üretimi açısından incelemeye alınır.

Kültür tabanlı yöntemler arasında kromojenik besiyerlerinin kullanılması örneklerin direkt ekimlerinden sonra kolonilerin rahatça seçilebilmesini ve zenginleştirme adımının olmamasından dolayı suşların daha kısa sürede tanımlanmasını sağlamaktadır. Kromojenik besiyerinde karbapenemaz üreten izolatlar ile besiyerlerindeki enzimatik etkileşim sonucu karbapenem dirençli

izolatlar farklı renklerde görülür. ChromID, SUPERCARBA, Brilliance CRE, CHROMagar KPC gibi besiyerleri mevcuttur (108).

2.8.2.1.7. Otomatize Sistem

BD Phoenix CPO Detect testi (Becton Dickinson and Company, ABD), bilgisayar destekli algoritma tabanlı algılama ile otomatik antibiyotik duyarlılık testi (ADT) panellerine dahil edilmek üzere tasarlanmıştır. Test, BD Phoenix ADT panelinde, karbapenemazların saptanması ve sınıflandırılması için her biri tek başına bulunan bir beta-laktam antibiyotik ve çeşitli beta-laktam antibiyotikle beta-laktamaz inhibitörleri kombinasyonunu da içeren kuyucuklardan oluşur. Karbapenemaz üretimini pozitif veya negatif olarak belirler. Üretilen karbapenemazı Ambler sınıflandırmasına göre sınıflar. Bazı izolatlar için karbapenemaz ürettiğini belirten pozitif sonucu vermesine rağmen, üretilen karbapenemazı Ambler sınıflandırmasında herhangi bir sınıfa dahil edemeyebilir. Yani bazı izolatlarda karbapenemaz ürettiği tespit edilse de, üretilen karbapenemaz tiplendirilemez (109).

2.8.2.2. Genotipik Yöntemler

Fenotipik doğrulama testlerinin sınırlamaları nedeniyle PZR, dizilemeyle birlikte konvansiyonel PZR, multipleks PZR ve nükleik asit hibridizasyonu gibi moleküler yöntemler karbapenemaz tespitinde altın standart olarak kabul edilmektedir (110). Karbapenemaz tespitinde hızlı tanımlama yapması, yüksek duyarlılıkta olması ve epidemiyolojik çalışmalara katkısıyla genotipik temelli testler fenotipik testlere göre daha avantajlıdır. Ancak moleküler yöntemlerin hedef gendeki çeşitlilik, primer çapraz reaksiyonlar, deneyimli personel gerektirmesi ve yüksek maliyet gibi dezavantajları da vardır (111). Bazen belirli bir beta-laktamaz sınıfından birden fazla direnç geni barındıran izolatlarda doğru şekilde tanımlama yapılamayabilir. Moleküler testler yalnızca belirli karbapenemaz genlerini tespit eder, yeni veya henüz bilinmeyen direnç genlerini tespit edemez. Bundan dolayı karbapenemaz üretiminin ilk tespitinde kullanılması önerilmez (112).

Karbapenemaz genlerinin dizisini belirlemek için DNA dizilimi de kullanılabilir. Nükleik asit mikroyarray yöntemlerinin direnç genlerinin karakterizasyonunda ve moleküler epidemiyolojide önemli olduğu bilinmektedir.

Mikrodizi hibridizasyonu, kısa bir süre içinde çok sayıda farklı geni aynı anda tespit edebilen tanımlama yöntemidir (113).

Ayrıca pulsed-field jel elektroforezi (PFGE), multi-lokus sekans tipleme (MLST) ve tekrarlayan ekstragenik palindromik sekans bazlı PZR (REP-PCR) karbapenem dirençli izolatların moleküler epidemiyolojisini incelemeye yönelik yöntemlerdendir. Direnç mekanizmasının yayılımını karakterize etmek için kullanılırlar (114).

Tüm genom dizileme (WGS) karbapenem direncinin nedenini tanımlamak için bir bakterinin tüm genomik içeriğini, kromozomal ve kromozom dışı içeriğine ulaşabilen moleküler yöntemlerdendir (115-117). Ayrıca, WGS izolatın diğer izolatlarla ilgisini, karbapenemazı kodlayan plazmit tiplerini, karbapenem direncini etkileyen diğer faktörler (örneğin, porin mutasyonları) ve ek direnç faktörlerinin varlığı dahil olmak üzere bakteriye ait birçok özelliği tanımlayabilir. Ancak maliyetinin yüksek olması, deneyimli personel ve ekipman gerektirmesi en büyük dezavantajlarıdır (99).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Bilgileri

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilip 16.02.2023 tarihinde 3/28 karar numarası ile onaylanmıştır.

3.2. Güç Analizi ve Çalışmaya Alınan Suşların Sayısının Belirlenmesi

Çalışmanın güç analizi GPower 3.1.9.6 (Universitaet kiel, Germany) ile gerçekleştirildi. Örneklem hesaplamasında etki büyüklüğünü belirlemek için çalışmamızın hipotezine zemin oluşturan çalışma ve bu çalışma rehberliğinde yapmış olduğumuz pilot çalışmada elde edilen veriler kullanıldı. Test ailesi olarak “F test” ve analiz olarak “MANOVA: Repeated measures, within-between interaction” seçildi. Tip-1 hata payı 0,05 ve %95 güç değeri kullanılarak her bir bakteri grubu için minimum suş sayısı n=14 olarak hesaplandı (Kritik tablo F=1,933).

Güç analizine göre 15 adet Sınıf A, 15 adet Sınıf B, 15 adet Sınıf D karbapenemaz üreten ve 15 adet karbapenemaz üretmediği bilinen (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM/IMP} negatif) toplamda 60 adet suş dBLIMplus yönteminin validasyonunu yapabilmek için kullanıldı.

Validasyon suşlarının dBLIMplus test sonuçları tamamlanıp dBLIMplus değerlendirme kriterleri belirlendikten sonra dBLIMplus’ın rutin laboratuvarında kullanılabilirliğini değerlendirmek için 100 adet klinik suş çalışmaya dahil edildi. Her bir hastadan izole edilen yalnızca bir bakteri suşu çalışmaya alındı.

3.3. Pilot Çalışma

Karbapenemlere dirençli, mCIM pozitif, BD MAXTM Check-Points CPO testi ile direnç geni belirlenmiş olan 1 adet KPC pozitif, 1 adet NDM pozitif, 1 adet OXA-48 pozitif suş ve karbapenemlere duyarlı, mCIM negatif, BD MAXTM Check-Points CPO testi ile karbapenemaz geni tespit edilmemiş olan 1 adet suş olmak üzere toplam 4 adet *K. pneumoniae* suşuna dBLIMplus uygulanmıştır. Kombinasyon disk setinde bulunan diskler ile elde edilen 6.-12.-18. saatlerdeki inhibisyon zon çapları

not alınmıştır. Bu veriler, validasyon için gereken suş sayılarının belirlenmesinde kullanılmıştır.

3.4. Çalışmaya Alınan Suşların Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılıkları

Ocak 2022-Ocak 2024 tarihleri arasında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Bakteriyoloji laboratuvarına çeşitli servislerden gönderilen örneklerin (kan, idrar, balgam, trakeal aspirat, yara, abse) %5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye) ve EMB agar (RTA, Türkiye) ve çikolata agar (RTA, Türkiye) vb. besiyerlerine rutin kültür ekimleri yapılmıştır. Kan kültürleri ise Render BC128 (Shandong Huifa Electronics Technology, Çin) otomatize kan kültürü cihazında inkübe edilmiş ve üreme sinyali sonrası rutin kültür ekimleri yapılmıştır. Ekim sonrası besiyerleri $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. Kültürde üremesi olan, Gram negatif basil şeklinde görülen, katalaz pozitif, oksidaz negatif bakterilerin *Enterobacterales* takımından bir bakteri olabileceği öngörüsüyle BD Phoenix 100 (Becton Dickinson and Company, ABD) otomatize cihazı ile tanımlama ve antibiyotik duyarlılığı çalışılmıştır. Bakteri izolatları çalışma yapılana kadar %16 gliserollü TSB besiyerinde stoklanarak -80°C 'de saklanmıştır. Bakteriler çalışmaya alınmadan önce dondurulmuş stoklar oda ısısında yarı çözülene kadar bekletilerek %5 koyun kanlı agara pasaj alınmış ve $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyonun 24. saatinde tekrar %5 koyun kanlı agara pasaj alınarak $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübasyona bırakılmış ve taze üreyen bakteriler çalışma için kullanılmıştır.

3.4.1. BD Phoenix 100

Bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik duyarlılıkları için BD Phoenix 100 UNMIC/ID-NMIC/ID (Becton Dickinson and Company, ABD) panelleri kullanılmıştır. Saf üremiş olan 1-2 bakteri kolonisinden Phoenix ID sıvısı (4,5 ml) içinde Crystal Spec nefelometre (BD, ABD) ile 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Phoenix AST sıvısına (8,0 ml) firmanın önerileri doğrultusunda 1 damla AST indikatörü eklenerek çalkalamadan hafif alt-üst edilerek homojen karışım oluşturulduktan sonra steril pipet ile hazırlanan bakteri süspansiyonundan 25 μL bakteri ID tüpünden AST tüpüne aktarılmıştır. Panel

üzerinde ID sıvısını, ID yuvasına ve AST sıvısını, AST yuvasına aktardıktan sonra panel üzerindeki yuva kapakları kapatılarak panel yüklemeye hazır hale getirilmiştir. Paneller BD Phoenix 100 otomatize cihaza yüklendikten sonra sonuçlar için 18-24 saat beklenmiştir.

3.5. Validasyon Suşlarının Seçimi

Hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni kabul edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* olarak tanımlanan suşlar arasında karbapenem grubu antibiyotiklerden (meropenem, ertapenem, imipenem) üçüne de dirençli olan ve karbapenem grubu antibiyotiklerden üçüne de duyarlı olan suşlara mCIM, KDT ve PZR uygulandı. Bu üç yöntemle tam uyumlu sonuç elde edilen suşlar validasyon suşu olarak çalışmaya dahil edildi. Buna göre; mCIM ve KDT pozitif, PZR sonuçları ile tek bir direnç geni tespit edilen 15 adet *bla*_{KPC} pozitif, 15 adet MBL pozitif (13 adet *bla*_{NDM} pozitif, 2 adet *bla*_{VIM/IMP} pozitif), 15 adet *bla*_{OXA-48} pozitif suş ve mCIM ve KDT negatif, PZR ile karbapenemaz üretmediği (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM/IMP} negatif) tespit edilen 15 adet suş olmak üzere toplamda 60 adet suş validasyon için seçildi. Daha sonra validasyon suşlarına dBLIMplus uygulanarak, dBLIMplus değerlendirme zon çapı kriterleri belirlendi.

3.6. Klinik Suşların Seçimi

Validasyon suşları ile yapılan dBLIMplus testleri değerlendirildikten sonra dBLIMplus'ın rutin laboratuvarında kullanılabilirliğini değerlendirmek için hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni kabul edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* olarak tanımlanan suşlardan karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli bulunup mCIM pozitif ve PZR ile karbapenemaz direnç geni saptanan 56 suş ve karbapenem grubu antibiyotiklere duyarlı bulunup mCIM negatif ve PZR ile herhangi bir karbapenemaz direnç geni tespit edilmeyen 44 adet suşa standart KDT ve dBLIMplus eş zamanlı uygulandı. Standart KDT üretici firma önerileri doğrultusunda, dBLIMplus ise validasyonla belirlenen zon çapı kriterlerine göre değerlendirildi.

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Karbapenem Direnç Genlerinin Saptanması

BD MAXTM Check-Points CPO testi (Becton Dickinson and Company, ABD) karbapenemaz direnç genlerinden *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM/IMP} ve *bla*_{OXA-48}'yi tespit edebilen gerçek zamanlı PZR testidir. Besiyerinde saf şekilde üreyen 1-2 bakteri kolonisi tek kullanımlık pamuk uçlu eküvyon çubuğu ile alınır ve örnek tampon tüpünde homojen şekilde karıştırılır. Bakteri ile süspanse edilmiş örnek tampon tüpünü, ekstraksiyon ve master mix tüplerini yerleştirdikten sonra BD MAXTM sistemi çalıştırılır. BD MAXTM sisteminde bakteri izolatlarına ait hücre lizisleri, DNA ekstraksiyonu, DNA konsantrasyonu, reaktif rehidrasyonu, nükleik asit dizisinin tespiti ve nükleik asit amplifikasyonu otomatik olarak gerçekleşir.

Amplifiye olmuş hedefler florofor ile işaretlenen hidroliz problemleriyle tespit edilir. Amplifiye olan hedef sinyallerin tespiti ve yorumlanması BD MAXTM sistemi tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir.

3.8. Kullanılan Sıvı Besiyerlerinin Hazırlanması

3.8.1. Trypticase Soy Broth

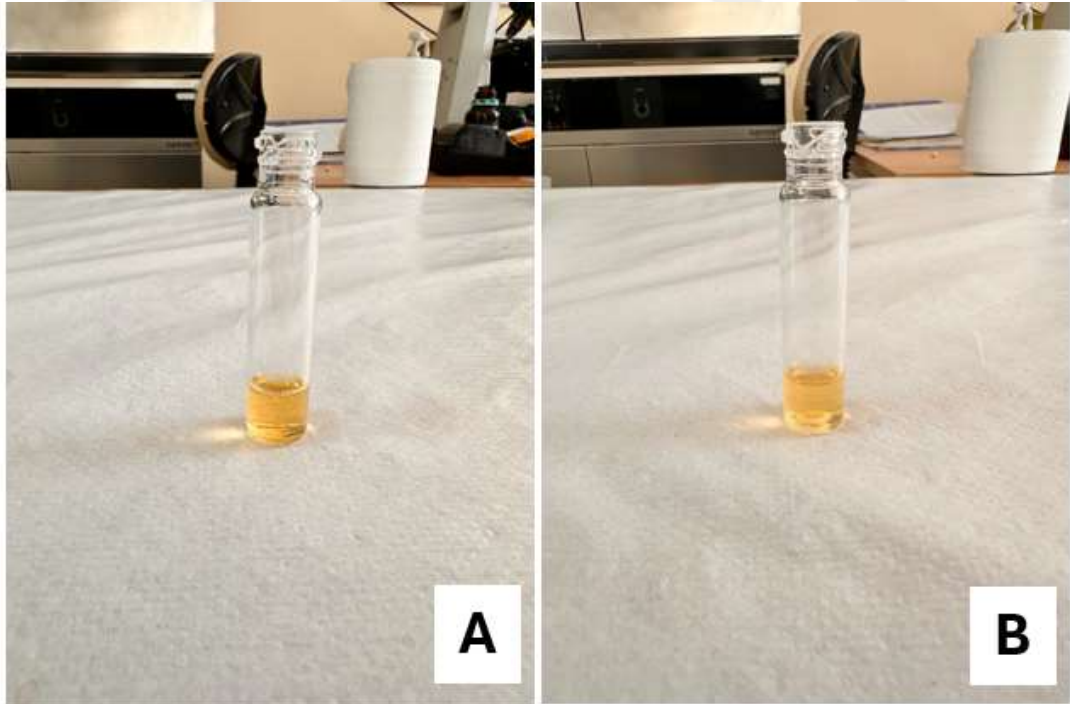
Modifiye CIM'de kullanmak için CLSI'nın önerdiği TSB besiyeri üretici firmadan (BD BBLTM TrypticaseTM Soy Broth) temin edilmiş ve firmanın kullanım talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır (118). Her çalışma günü için ayrı TSB besiyeri hazırlanmış olup kullanılmadan bir gün önce besiyeri sterilite kontrolü yapılmıştır.

3.8.2. Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth

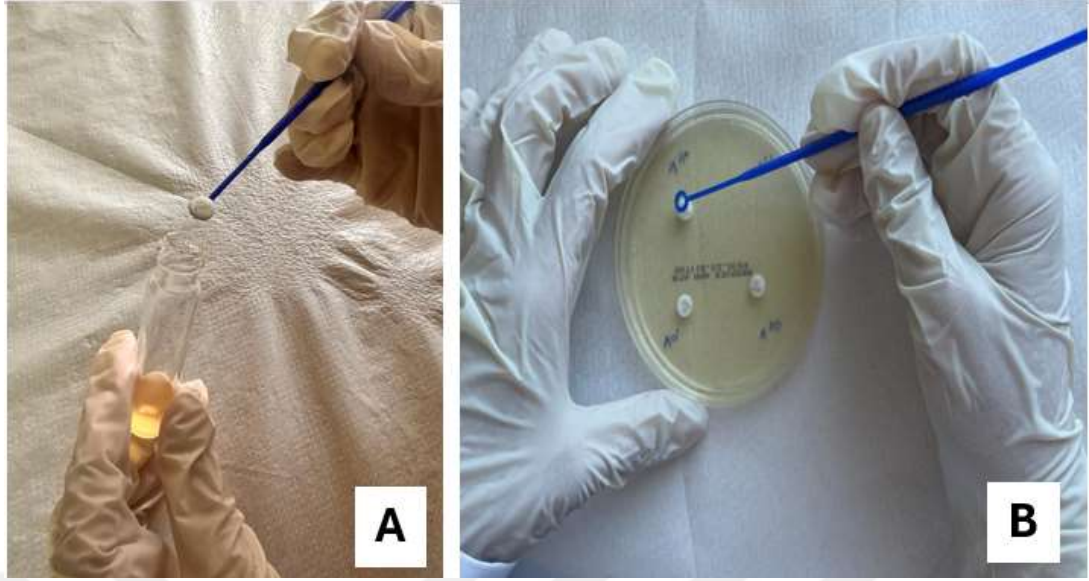
Bianco ve ark., dBLIM validasyon testleri sonucunda ekstraksiyon tamponu olarak Katyon Ayarlı Mueller-Hinton Broth (KAMHB) besiyerini önermişlerdir (19). Bu doğrultuda çalışmamızda dBLIMplus için ekstraksiyon tamponu olarak kullanılan KAMHB besiyeri üretici firmadan [BD BBLTM Mueller-Hinton II Broth (Cation-Adjusted)] temin edilmiş ve firmanın kullanım talimatları doğrultusunda hazırlanmıştır. Her çalışma günü için ayrı KAMHB besiyeri hazırlanmış olup kullanılmadan bir gün önce besiyeri sterilite kontrolü yapılmıştır.

3.9. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu

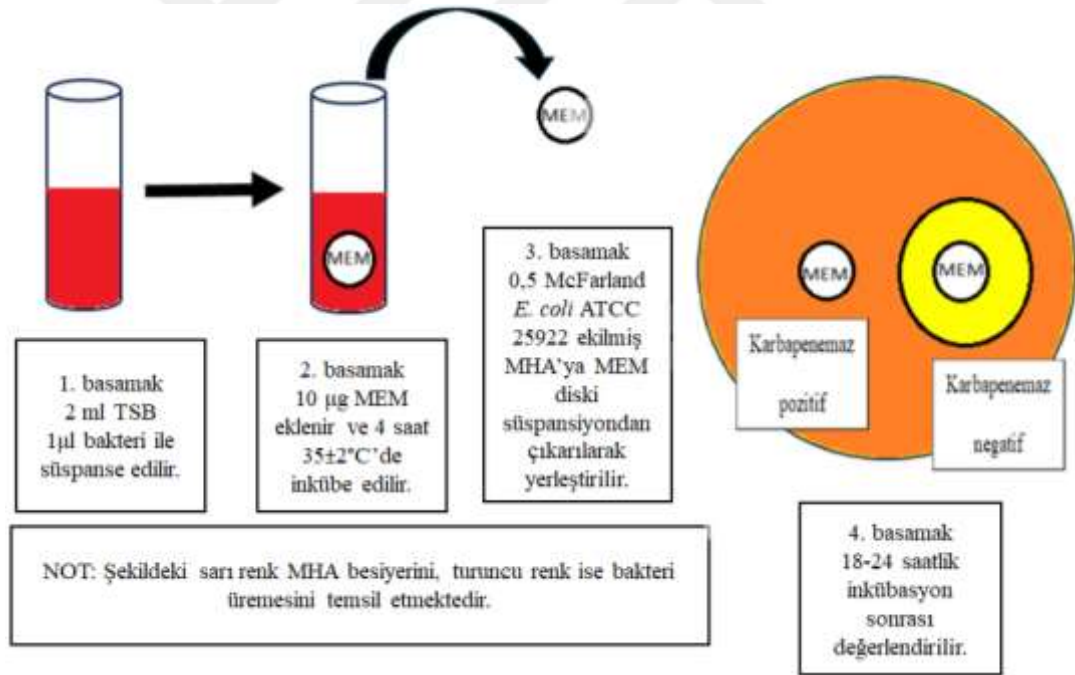
Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü M100 Performans Standartları'nda açıklandığı gibi bu metotta *Enterobacterales* için 1 µl bakteri 2 ml TSB ile steril tüpte 10-15 saniye vortekslenerek süspanse edildi (Resim 3.1 A). Daha sonra bu süspanسیون içine 10 µg MEM (Becton Dickinson and Company, ABD) diski yerleştirilerek $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de normal atmosfer koşullarında etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı (Resim 3.1 B). İnkübasyon sonunda MEM diski 10 µl'lik tek kullanımlık öze ile diskten fazla sıvıyı dışarı atmak için halkayı tüpün iç kenarı boyunca sürükleyerek çıkartıldı. İnkübasyon sonunun hemen öncesi ya da sonrası 4 ml fizyolojik tuzlu su içinde 0,5 McFarland standardında *E. coli* ATCC 25922 referans suşu süspanسیونu hazırlandı ve daha sonra steril pamuklu eküvyon çubuğu inokulum süspanسیونu içine daldırıldı, inokulum MHA (Becton Dickinson and Company, ABD) yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde yayıldı. Plağın kuruması için 3-10 dakika beklendikten sonra, MEM diski çıkarıldı (Resim 3.2 A) ve MHA plağına yerleştirilerek (Resim 3.2 B) $35\pm2^{\circ}\text{C}$ 'de normal atmosfer etüvünde 18-24 saat inkübe edildi (118). Şekil 3.1'de mCIM uygulama şeması gösterilmiştir.



Resim 3.1. mCIM için bakteri süspanسیونu hazırlanması (A) ve MEM diski ile inkübasyona bırakılması (B)



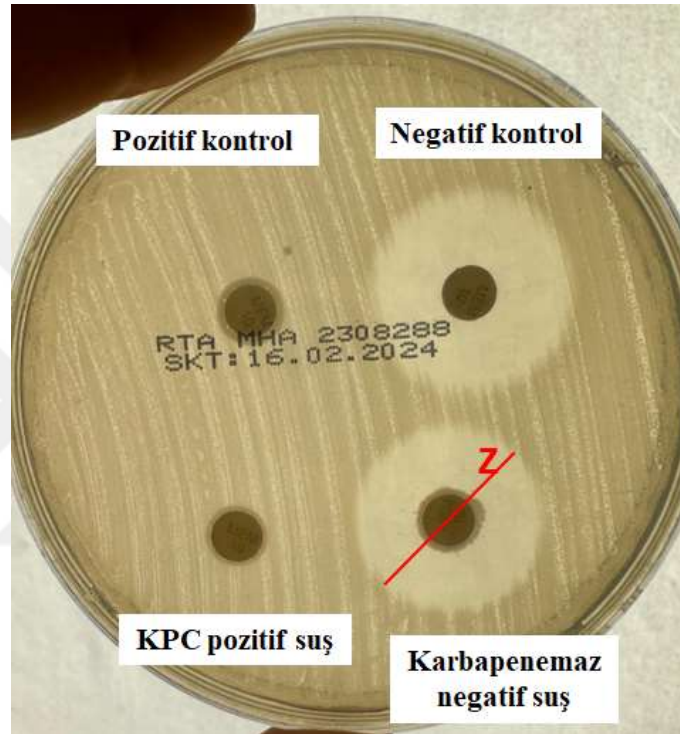
Resim 3.2. İnkübasyonu tamamlanan MEM diskinin çıkarılması (A) ve 0,5 McFarland *E. coli* ATCC 25922 suşu ekilmiş MHA'ya diskin yerleştirilmesi (B)



Şekil 3.1. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu uygulama şeması

İnhibisyon zon çapı okuması inkübasyonun sonunda (18-24 saat) yansıyan ışıkla aydınlatılmış koyu renkli bir zemin üzerinde plağın arka yüzünden yapıldı (Resim 3.3). Zon çapı 6-15 mm arasında veya 16-18 mm arasında zon çaplarına sahip olup zon içinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler varsa karbapenemaz pozitif,

zon ≥ 19 mm ise karbapenemaz negatif olarak tanımlandı. Zon ≥ 19 mm olup içerisinde iğne ucu büyüklüğünde koloniler varsa karbapenemaz hakkında yorum yapılamaz şeklinde değerlendirildi (118). Pozitif kontrol olarak *bla*_{KPC} (A sınıfı) geni için *K. pneumoniae* NCTC 13438, *bla*_{NDM} (B sınıfı) geni için *K. pneumoniae* NCTC 13443, *bla*_{OXA-48} (D sınıfı) geni için *K. pneumoniae* NCTC 13442 ve negatif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC BAA-1706 suşu kullanıldı.



* Z: İnhibisyon zon ≥ 19 mm

Resim 3.3. 18-24 saat inkübasyon süresi sonunda mCIM değerlendirilmesi

3.10. Kombinasyon Disk Testi

3.10.1. D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus Disk Seti

D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus Disk Seti (Mast Diagnostics, Liverpool, Birleşik Krallık), *Enterobacterales* tarafından üretilen MBL, KPC, OXA-48 benzeri karbapenemazları tespit etmekte ve KPC üreten izolatları AmpC üreten izolatlardan ayırmayı sağlamaktadır.

D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus karbapenemaz disk seti antibiyotikleri:

A: Penem 10 µg

B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü

C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü

D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü

E: TEM + MBL inhibitörü

Üreyen taze kolonilerden steril eküvyonla 3-5 tane alınarak 4 ml fizyolojik tuzlu su içinde 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril pamuklu eküvyon çubuğu inokulum süspansiyonu içine daldırıldı ve inokulum MHA yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde yayıldı. En geç 15 dakika içerisinde MHA plağına A, B, C, D ve E antibiyotik diskleri yerleştirildi ve 35±2°C’de normal atmosfer koşullarında etüvde inkübasyona bırakıldı.

İnhibisyon zon çapı okuması inkübasyonun 18-24 saatinde yansıyan ışıqla aydınlatılmış koyu renkli bir zemin üzerinde plağın arka yüzünden yapıldı. Üretici firmanın belirlediği kriterlere göre değerlendirildi.

D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus karbapenemaz disk seti zon çapı yorumlama kriterleri:

$[Z_{B-A} \geq 5 \text{ mm}] + [Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5 \text{ mm}]$ ise: MBL üretiyor

$[Z_{C-A} \geq 5 \text{ mm}] + [Z_{B-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5 \text{ mm}]$ ise: KPC üretiyor

$[Z_{B-A} \text{ ve } Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5] + [Z_E \leq 10 \text{ mm}]$ ise: OXA-48 benzeri üretiyor

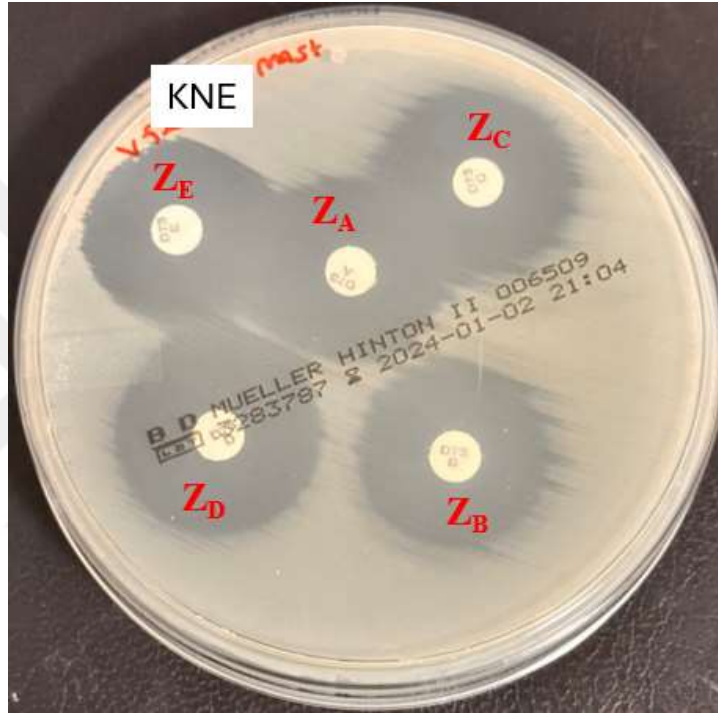
$[Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} \geq 5 \text{ mm}] + [Z_{B-A} < 4 \text{ mm}]$ ise: AmpC üretiyor ve porin kaybı mevcut

$[Z_{B-A} \text{ ve } Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} \leq 2 \text{ mm}] + [Z_E > 10 \text{ mm}]$ ise: Karbapenemaz üretmiyor

Sonuçlar, hem manuel olarak inhibisyon zon çapı farkları hesaplanarak hem de <https://www.mast-group.com/> web adresinden indirilen D73C-Carba_Plus_Calculator_V2.4.xlsx hesaplama programı ile belirlendi.

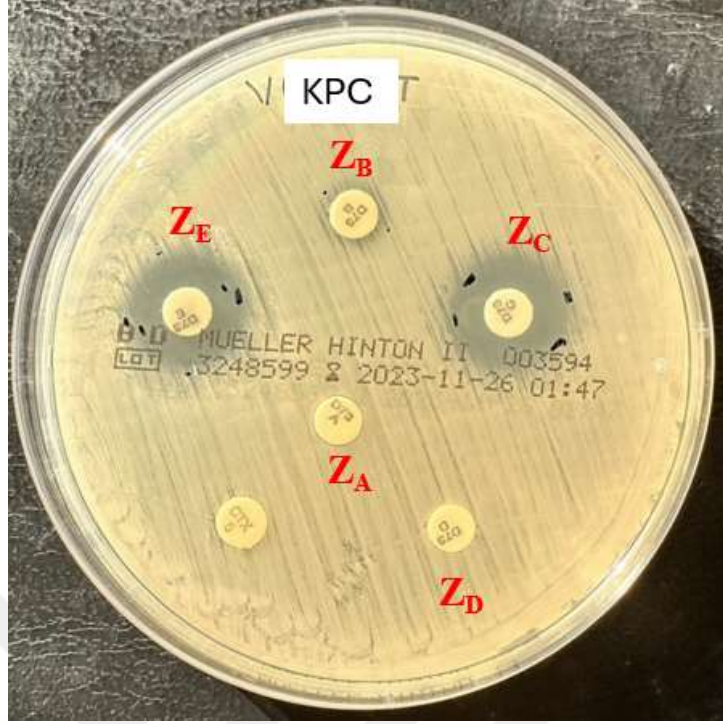
Pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* NCTC 13438 *bla*_{KPC} geni pozitif (A sınıfı), *K. pneumoniae* NCTC 13443 *bla*_{NDM} geni pozitif (B sınıfı), *K. pneumoniae* NCTC 13442 *bla*_{OXA-48} geni pozitif (D sınıfı), *E. cloacae* NCTC 13406 AmpC pozitif, *K. pneumoniae* ATCC 700603 GSBL pozitif ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

Resim 3.4-7’de sırasıyla karbapenemaz negatif, KPC pozitif, OXA-48 pozitif ve NDM pozitif suşlara ait KDT örnekleri verilmiştir.



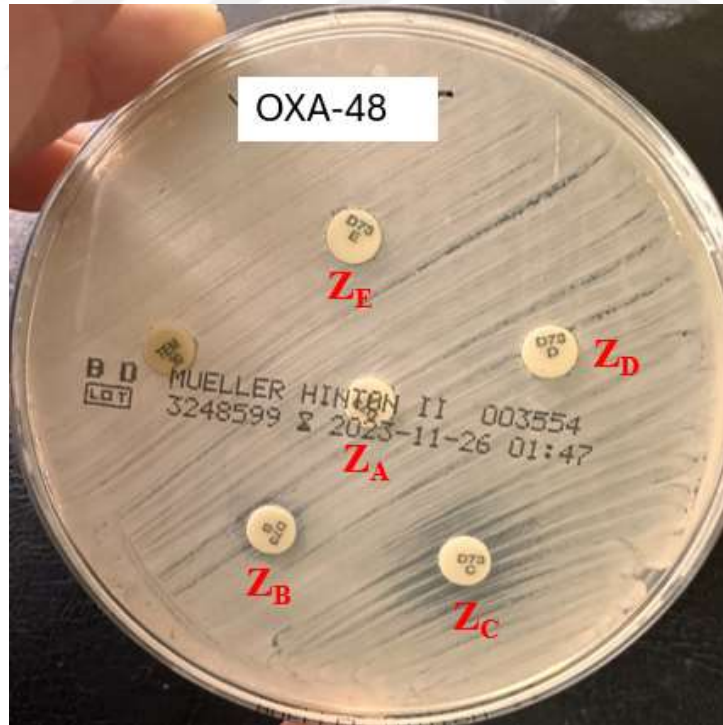
$[Z_{B-A} \text{ ve } Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} \leq 2 \text{ mm}] + [Z_E > 10 \text{ mm}]$

Resim 3.4. Karbapenemaz negatif suşun KDT örneği



$[Z_{C-A} \geq 5 \text{ mm}] + [Z_{B-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5 \text{ mm}]$

Resim 3.5. KPC pozitif suşun KDT örneği



$[Z_{B-A} \text{ ve } Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5] + [Z_E \leq 10 \text{ mm}]$

Resim 3.6. OXA-48 pozitif suşun KDT örneği



$$[Z_{B-A} \geq 5 \text{ mm}] + [Z_{C-A} \text{ ve } Z_{D-A} < 5 \text{ mm}]$$

Resim 3.7. NDM pozitif suşun KDT örneği

3.10.2. D68C-MASTDISCS® Combi ESBL & AmpC Tanımlama Disk Seti

D68C-MASTDISCS® Combi ESBL & AmpC Tanımlama Disk Seti (Mast Diagnostics, Liverpool, Birleşik Krallık) *Enterobacterales* izolatlarında AmpC ve/veya GSBL varlığını fenotipik olarak doğrulayan kombinasyon disk setidir. Çalışmaya alınan suşlardaki karbapenem direnci karbapenemaz enzimleri dışında AmpC ve/veya GSBL varlığıyla birlikte porin kaybı kaynaklı olarak da ortaya çıkabileceğinden, herhangi bir karbapenemaz direnç mekanizması ortaya konulamayan karbapenem dirençli suşlar bu disk seti ile de test edildi.

D68C-MASTDISCS® Combi ESBL & AmpC Tanımlama Disk Seti antibiyotikleri:

A: Sefpodoksim 10 µg

B: Sefpodoksim 10 µg + GSBL inhibitörü

C: Sefpodoksim 10 µg + AmpC inhibitörü

D: Sefpodoksim 10 µg + GSBL inhibitörü + AmpC inhibitörü

Üreyen taze kolonilerden steril eküvyonla 3-5 tane alınarak 4 ml fizyolojik tuzlu su içinde 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlandı, daha sonra steril pamuklu eküvyon çubuğu inokulum süspansiyonu içine daldırıldı ve inokulum MHA yüzeyinin her tarafına eşit olacak şekilde üç yönde yayıldı. Daha sonra 15 dakikayı geçmeden MHA antibiyotik diskleri yerleştirildi ve $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de normal atmosfer etüvünde inkübasyona bırakıldı.

İnhibisyon zon çapı okuması inkübasyonun 18-24 saatinde yansıyan ışıkla aydınlatılmış koyu renkli bir zemin üzerinde plağın arka yüzünden yapıldı. Üretici firmanın belirlediği kriterlere göre değerlendirildi.

D68C-MASTDISCS® ESBL & AmpC Tanımlama Disk Seti zon çapı yorumlama kriterleri:

$[Z_{B-A} \text{ ve } Z_{D-C} \geq 5 \text{ mm}] + [B \text{ ve } D \text{ diskleri ile } C \text{ ve } A \text{ diskleri arasındaki zon çapı farkı} \leq 4 \text{ mm}]$ ise: ESBL aktivitesi gösteriyor

$[Z_{D-B} \text{ ve } Z_{C-A} \geq 5 \text{ mm}] + [A \text{ ve } B \text{ diskleri ile } C \text{ ve } D \text{ diskleri arasındaki zon çapı farkı} \leq 4 \text{ mm}]$ ise: AmpC aktivitesi gösteriyor

$[Z_{D-C} \geq 5 \text{ mm}] + [A \text{ ve } B \text{ diskleri arasındaki zon çapı farkı} \leq 4 \text{ mm}]$ ise: ESBL & AmpC aktivitesi gösteriyor

A, B, C ve D diskleri arasındaki zon çapları farkı $\leq 2 \text{ mm}$ ise: ESBL & AmpC aktivitesi göstermiyor

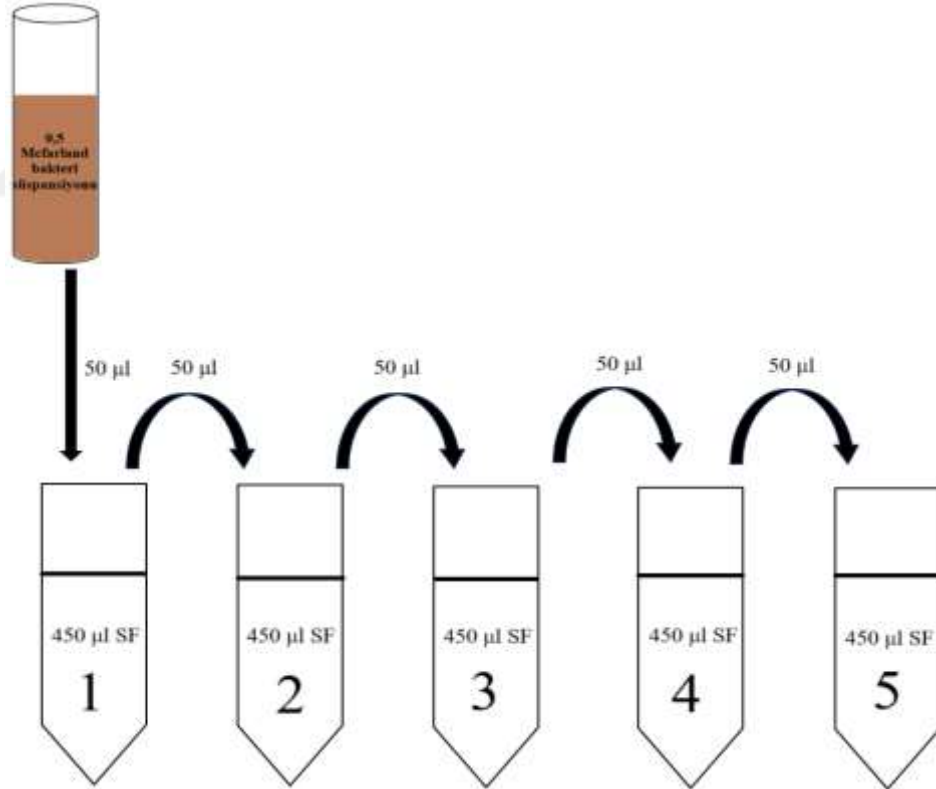
Sonuçlar, hem manuel olarak inhibisyon zon çapı farkları hesaplanarak hem de <https://www.mast-group.com/> web adresinden indirilen D68C-ESBL_AmpC_Calculator_v10.5.xlsx hesaplama programı ile belirlendi.

Pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603 GSBL pozitif, *E. cloacae* NCTC 13406 AmpC pozitif ve negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

3.11. Kombinasyon Diskleri Kullanılarak Doğrudan Beta-laktam İnaktivasyon Metodu (dBLIMplus)

3.11.1. Kan Kültürü Şişelerine Aktarılmak Üzere Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

Üreyen taze kolonilerden steril eküvyonla 3-5 tane alınarak 4 ml fizyolojik tuzlu su içinde 0,5 McFarland standardında bakteri süspansiyonu hazırlandı. Daha sonra 5 adet 2 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün her biri 1'den 5'e kadar numaralandırıldı ve her birine 450 µl fizyolojik tuzlu su aktarıldı. Bakteri süspansiyonundan 50 µl alınarak 1 numaralı santrifüj tüpüne aktarıldı ve vortekslendi. Her bir mikrosantrifüj tüpünden 50 µl alındı ve bir sonraki tüpe aktarıldı, son tüpte (5 numara) 0,5 ml 10^3 CFU/ml bakteri olacak şekilde sırasıyla 1'den 5'e kadar seri dilüsyon yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kan kültürlerine aktarılmak üzere bakteriyel süspansiyon hazırlama şeması

3.11.2. Kan Kültürü Şişelerine Bakterilerin Aktarılması ve Kan Kültürü Şişelerinin İnkübasyona Bırakılması

Bianco ve ark. çalışmalarında dBLIM'de aerobik kan kültürü şişelerinin anaerobik şişelere göre karbapenemaz tespitinde daha iyi sonuç verdiğini tespit ettikleri için dBLIMplus için aerobik kan kültürü şişeleri tercih edilmiştir (19). Çeşitli klinik servislerden laboratuvara gönderilen ve 5 günlük inkübasyondan sonra üreme sinyali vermeyen aerobik kan kültürü şişeleri otomatize kan kültürü cihazından çıkarıldı. Negatif kan kültürü şişelerine 0,5 ml 10^3 CFU/ml bakteri 2,5 ml'lik steril enjektörle aktarıldı ve otomatize kan kültürü cihazında inkübasyona bırakıldı. Test edilen bakteri suşlarının üremesini doğrulamak ve saflık kontrolü için pozitifleşen kan kültürlerinin %5 koyun kanlı agara kültür ekimleri yapıldı.

3.11.3. Pozitif Sinyal Veren Kan Kültürü Şişelerine dBLIMplus Uygulaması

Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden enjektörle 10 ml kültür sıvısı çekilip 15 ml'lik steril santrifüj tüpüne aktarılarak 1.400 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant 15 ml'lik boş bir steril santrifüj tüpüne pastör pipeti yardımıyla aktararak 10 dakika 3.600 rpm'de santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant steril pastör pipeti ile atılarak, çökelti 10 ml distile su ile süspanse edildi ve yeniden 10 dakika 3.600 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atılıp çökelti 1 ml ekstraksiyon tamponu (KAMHB) ile süspanse edildi. Kan kültürü şişelerine uygulanan bu kademeli santrifüjleme yöntemi ile test edilecek bakteri süspansiyonu elde edilmiş oldu (Resim 3.8 A-T).

D73C-MASTDISCS® Combi Carba Plus antibiyotik diskleri (A, B, C, D, E) her biri ayrı steril 2 ml'lik 5 adet U tabanlı mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek üzerlerine elde edilen süspansiyondan 200 µl eklenip $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. Eş zamanlı 1,0 McFarland standardında 200 µl *E. coli* ATCC 25922 referans suşu MHA plağına aktarıldı, steril pamuklu eküvyon çubuğu ile plağın her tarafında eşit olacak şekilde üç yönde yayıldı, antibiyotik kombinasyon diskleriyle paralel olarak $35\pm 2^\circ\text{C}$ 'de normal atmosfer koşullarında etüvde 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra diskler 10 µl'lik tek kullanımlık öze ile diskten fazla sıvıyı dışarı atmak için halkayı mikrosantrifüj tüpünün iç kenarı boyunca sürükleyerek çıkarıldı, önceden

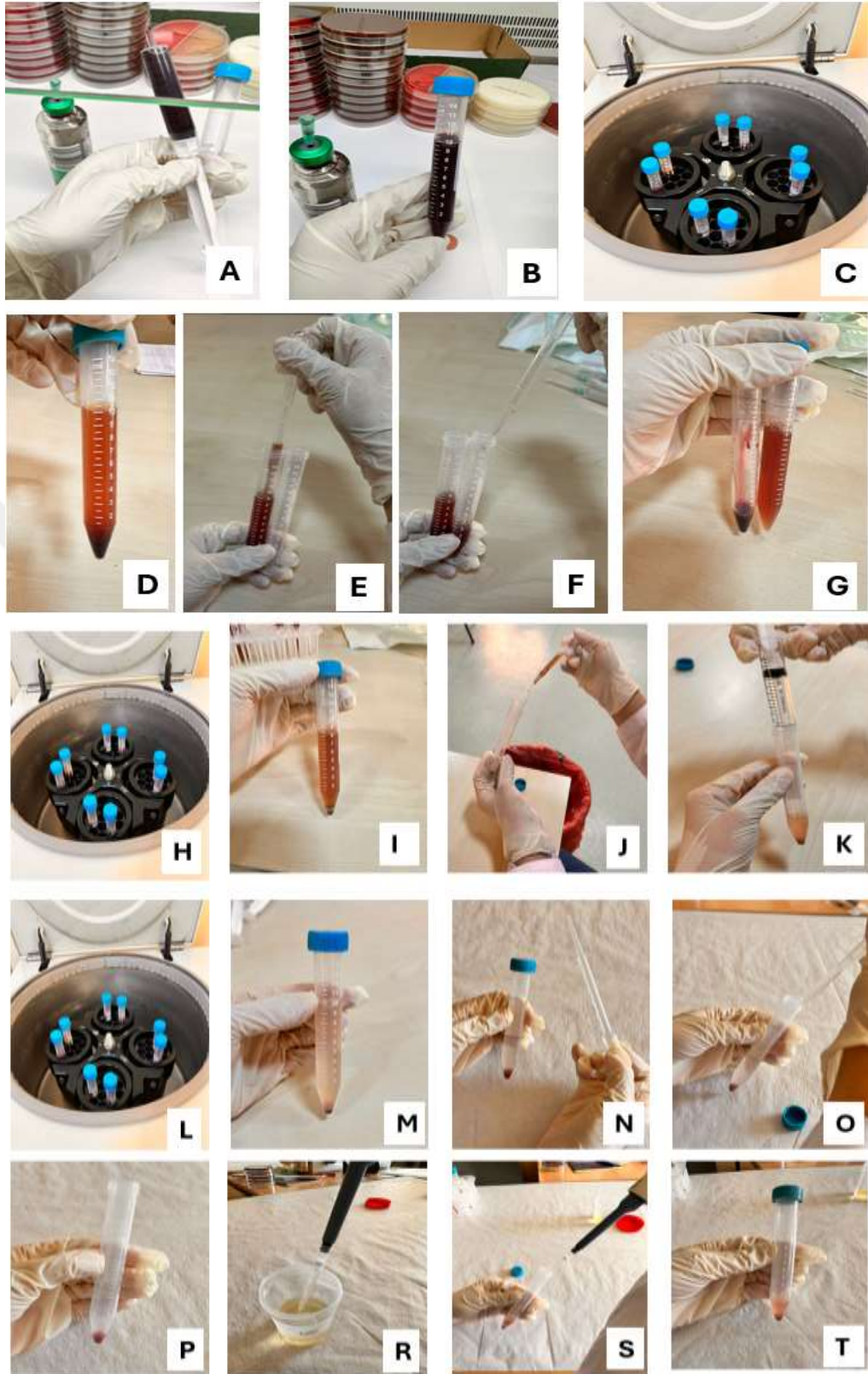
inkübe edilmiş MHA plaklarına yerleştirilip $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi (Resim 3.9 A-I). Şekil 3.3'te dBLIMplus çalışma basamakları özetlenmiştir.

3.11.4. dBLIMplus'ın Değerlendirilmesi

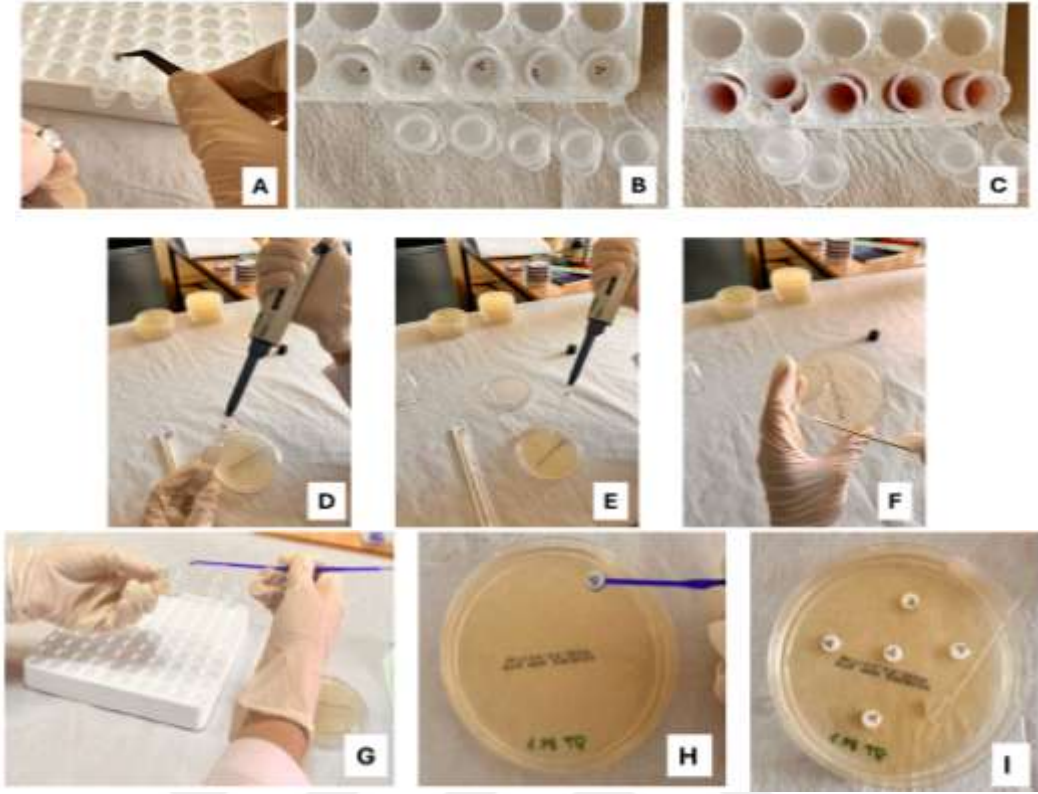
İnkübasyon süresi içerisinde 6-12-18. saatlerde inhibisyon zon çapları yansıyan ışık altında, plağın kapağı çıkarılmış olarak, plağın önünden görsel olarak ölçülerek not edildi. Objektif bir değerlendirme olması için görsel değerlendirmelerin tümü iki laboratuvar personeli tarafından gerçekleştirilerek zon çapları belirlenmiştir.

3.12. İstatiksel Analiz

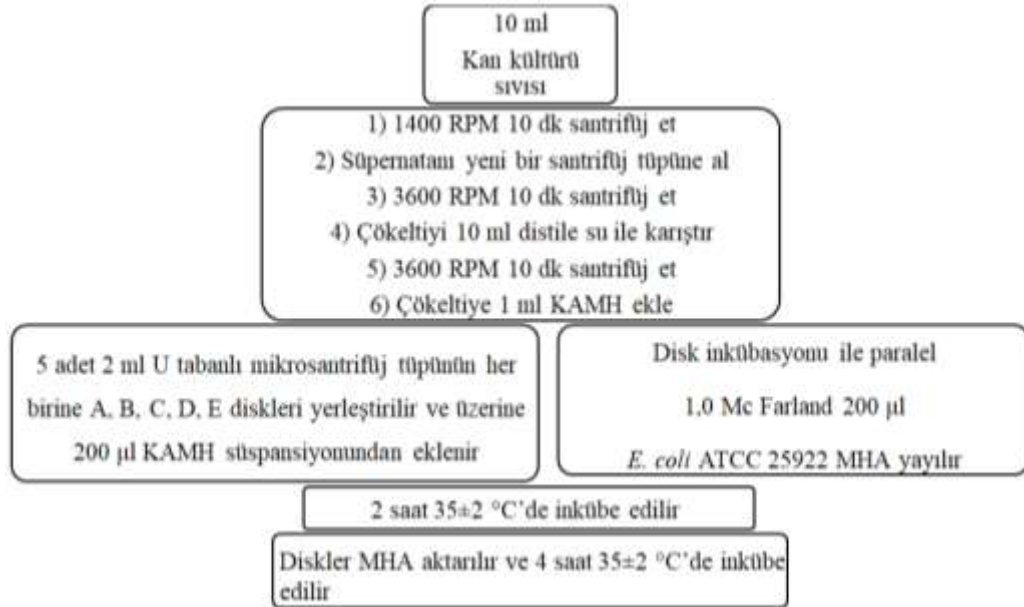
Çalışmanın güç analizi GPower 3.1.9.6 (Universitaet kiel, Germany) ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmada elde edilen verilerin analizleri SPSS 26.0 programı ile yapılmıştır. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir. dBLIMplus testinin duyarlılığı PZR altın standart yöntem kabul edilerek belirlenmiştir. dBLIMplus ve KDT ile elde edilen sonuçların PZR sonuçları ile karşılaştırılması için Mc nemar testi, uyumunu belirlemek için Cohen kappa analizi uygulanmıştır.



Resim 3.8. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişesinden dBLIMplus uygulamak üzere bakteri süspansiyonunun elde edilmesi



Resim 3.9. Bakteri süspansiyonunun kombinasyon diskleri üzerine aktarılması ve *E. coli* ATCC 25922 referans suşu ekilmiş MHA'da dBLIMplus uygulaması



Şekil 3.3. Pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerine dBLIMplus uygulama basamakları

4. BULGULAR

4.1. Validasyon Suşlarının Özellikleri

Validasyon için çalışmaya dahil edilen 60 adet *Enterobacterales* suşunun izole edildiği klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Validasyonda kullanılan suşların büyük kısmı yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların kan ve idrar örneklerinden izole edilmiştir. Validasyon suşları dört gruba ayrılmış, karbapenemaz negatif (*bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM/IMP} negatif) olanlar V1-V15 arası, D sınıfı karbapenemaz (OXA-48) üretenler V16-V30 arası, B sınıfı karbapenemaz (MBL) üretenler V31-V45 arası ve A sınıfı karbapenemaz (KPC) üretenler V46-V60 arası olacak şekilde numaralandırılmıştır (Tablo 4.2).

Tablo 4.1. Validasyon için çalışmaya dahil edilen 60 *Enterobacterales* suşunun izole edildiği klinik örneklerle ve servislere göre dağılımı [n (%)]

Servis	Örnek türü				Toplam
	Kan	İdrar	Yara	TA	
Yoğun Bakım	22 (36,6)	10 (16,7)	1 (1,7)	2 (3,4)	35 (58,4)
Dahili	12 (20)	5 (8,3)	-	-	17 (28,3)
Cerrahi	4 (6,6)	3 (5)	1 (1,7)	-	8 (13,3)
Toplam	38 (63,2)	18 (30)	2 (3,4)	2 (3,4)	60 (100)

TA: Trakeal aspirat

Tablo 4.2. Validasyon suşlarının grupları ve türlere göre dağılımları [n (%)]

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	Toplam
V1-V15 (KNE)	8 (13,3)	7 (11,7)	15 (25)
V16-V30 (OXA-48)	15 (25)	0 (0)	15 (25)
V31-V45 (MBL)	11 (18,3)	4 (6,7)	15 (25)
V46-V60 (KPC)	15 (25)	0 (0)	15 (25)
Toplam	49 (81,7)	11 (18,3)	60 (100)

KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*

4.1.1. Validasyon Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Durumları

Validasyon suşlarının antibiyotik duyarlılık profilleri Tablo 4.3'te verilmiştir. Karbapenemaz negatif validasyon suşları (V1-V15) için amoksisilin-klavulanik asit (AMC) (%60) hariç tüm antibiyotiklere duyarlılık %85'in üzerindeyken, karbapenemaz pozitif validasyon suşlarının (V16-V60) en duyarlı olduğu antibiyotiklerin kolistin (COL) (%64,4) ve amikasin (AN) (%60) olduğu görülmektedir. Suşların karbapenemaz direnç genlerine göre antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde OXA-48 pozitif suşların (CZA hariç), KPC ve MBL pozitif suşlara göre oldukça dirençli olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.3).

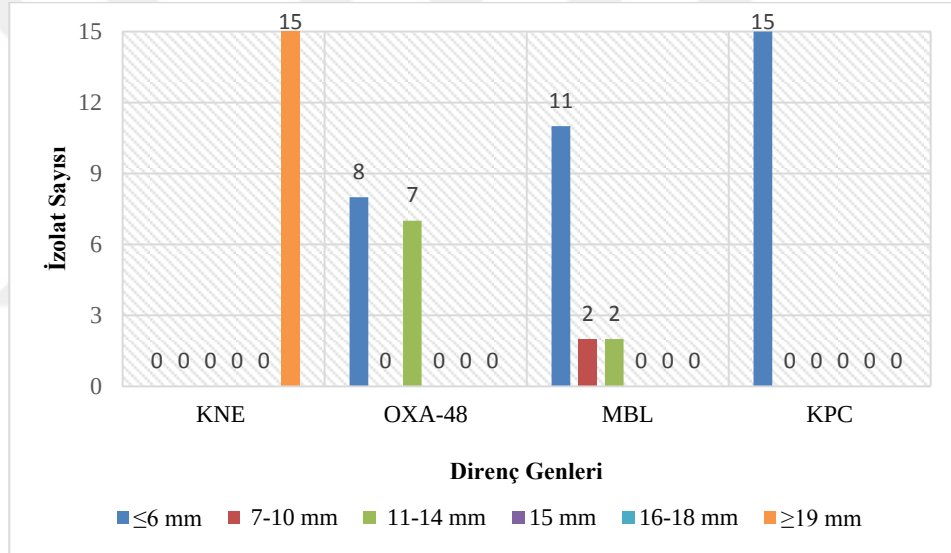
Tablo 4.3. Validasyon suşlarının antibiyotik duyarlılık durumları [n (%)]

ANTİBİYOTİKLER	Validasyon suşları				
	KNE (n=15)	OXA-48 (n=15)	MBL (n=15)	KPC (n=15)	KPE (n=45)
AN	15 (100)	3 (20)	11 (73,3)	13 (86,6)	27 (60)
GN	14 (93,3)	1 (6,6)	9 (60)	14 (93,3)	24 (53,3)
ETP	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
IMP	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MEM	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CAZ	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
CRO	15 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
AMC	9 (60)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
TZP	13 (86,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
SXT	13 (86,6)	5 (33,3)	4 (26,6)	6 (40)	15 (33,3)
CİP	14 (93,3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
LEV	14 (93,3)	0 (0)	2 (13,3)	0 (0)	0 (0)
CZA	15 (100)	13 (86,6)	0 (0)	11 (73,3)	24 (53,3)
COL	15 (100)	5 (33,3)	15 (100)	9 (60)	29 (64,4)

AN: Amikasin; GN: Gentamisin; ETP: Ertapenem; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; CRO: Seftriakson; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; TZP: Piperasilin-tazobaktam; SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol; CİP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; CZA: Seftazidim-avibaktam; COL: Kolistin; KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*; KPE: Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales*

4.1.2. Validasyon Suşlarının Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Bulguları

Validasyon suşlarının mCIM ile belirlenen MEM için inhibisyon zon çaplarının gruplara göre dağılımı Grafik 4.1’de, mCIM ile belirlenen sonuçların KDT ve PZR sonuçları ile karşılaştırılması Tablo 4.4’te gösterilmiştir. Karbapenemaz negatif grupta MEM için inhibisyon zon çapları 19-23 mm (ortalama 20,4) olup suşların tamamı mCIM negatif olarak değerlendirilirken; OXA-48 pozitif grupta 6-14 mm (ortalama 9,3); MBL pozitif grupta 6-12 mm (ortalama 7,06); KPC pozitif grubun tamamında 6 mm olarak ölçülmüş, KPE suşlarının tamamı mCIM pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tüm validasyon suşlarının mCIM sonuçları karbapenemaz varlığının tespiti açısından PZR ile uyumlu bulunmuştur.



Grafik 4.1. Validasyon suşlarının mCIM ile belirlenen meropenem zon çaplarının dağılımı

4.1.3. Validasyon Suşlarının Kombinasyon Disk Testi Bulguları

Tüm validasyon suşlarının kombinasyon disk testi sonuçları, PZR bulguları ile uyumlu bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Validasyon suşlarının mCIM, KDT ve PZR bulguları

Suş No	mCIM	KDT	PZR	Suş No	mCIM	KDT	PZR
V1	KNE	KNE	Negatif	V31	KPE	MBL	NDM
V2	KNE	KNE	Negatif	V32	KPE	MBL	NDM
V3	KNE	KNE	Negatif	V33	KPE	MBL	NDM
V4	KNE	KNE	Negatif	V34	KPE	MBL	NDM
V5	KNE	KNE	Negatif	V35	KPE	MBL	VIM/IMP
V6	KNE	KNE	Negatif	V36	KPE	MBL	NDM
V7	KNE	KNE	Negatif	V37	KPE	MBL	NDM
V8	KNE	KNE	Negatif	V38	KPE	MBL	NDM
V9	KNE	KNE	Negatif	V39	KPE	MBL	NDM
V10	KNE	KNE	Negatif	V40	KPE	MBL	NDM
V11	KNE	KNE	Negatif	V41	KPE	MBL	NDM
V12	KNE	KNE	Negatif	V42	KPE	MBL	NDM
V13	KNE	KNE	Negatif	V43	KPE	MBL	NDM
V14	KNE	KNE	Negatif	V44	KPE	MBL	NDM
V15	KNE	KNE	Negatif	V45	KPE	MBL	NDM
V16	KPE	OXA-48	OXA-48	V46	KPE	KPC	KPC
V17	KPE	OXA-48	OXA-48	V47	KPE	KPC	KPC
V18	KPE	OXA-48	OXA-48	V48	KPE	KPC	KPC
V19	KPE	OXA-48	OXA-48	V49	KPE	KPC	KPC
V20	KPE	OXA-48	OXA-48	V50	KPE	KPC	KPC
V21	KPE	OXA-48	OXA-48	V51	KPE	KPC	KPC
V22	KPE	OXA-48	OXA-48	V52	KPE	KPC	KPC
V23	KPE	OXA-48	OXA-48	V53	KPE	KPC	KPC
V24	KPE	OXA-48	OXA-48	V54	KPE	KPC	KPC
V25	KPE	OXA-48	OXA-48	V55	KPE	KPC	KPC
V26	KPE	OXA-48	OXA-48	V56	KPE	KPC	KPC
V27	KPE	OXA-48	OXA-48	V57	KPE	KPC	KPC
V28	KPE	OXA-48	OXA-48	V58	KPE	KPC	KPC
V29	KPE	OXA-48	OXA-48	V59	KPE	KPC	KPC
V30	KPE	OXA-48	OXA-48	V60	KPE	KPC	KPC

KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*; KPE: Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales*

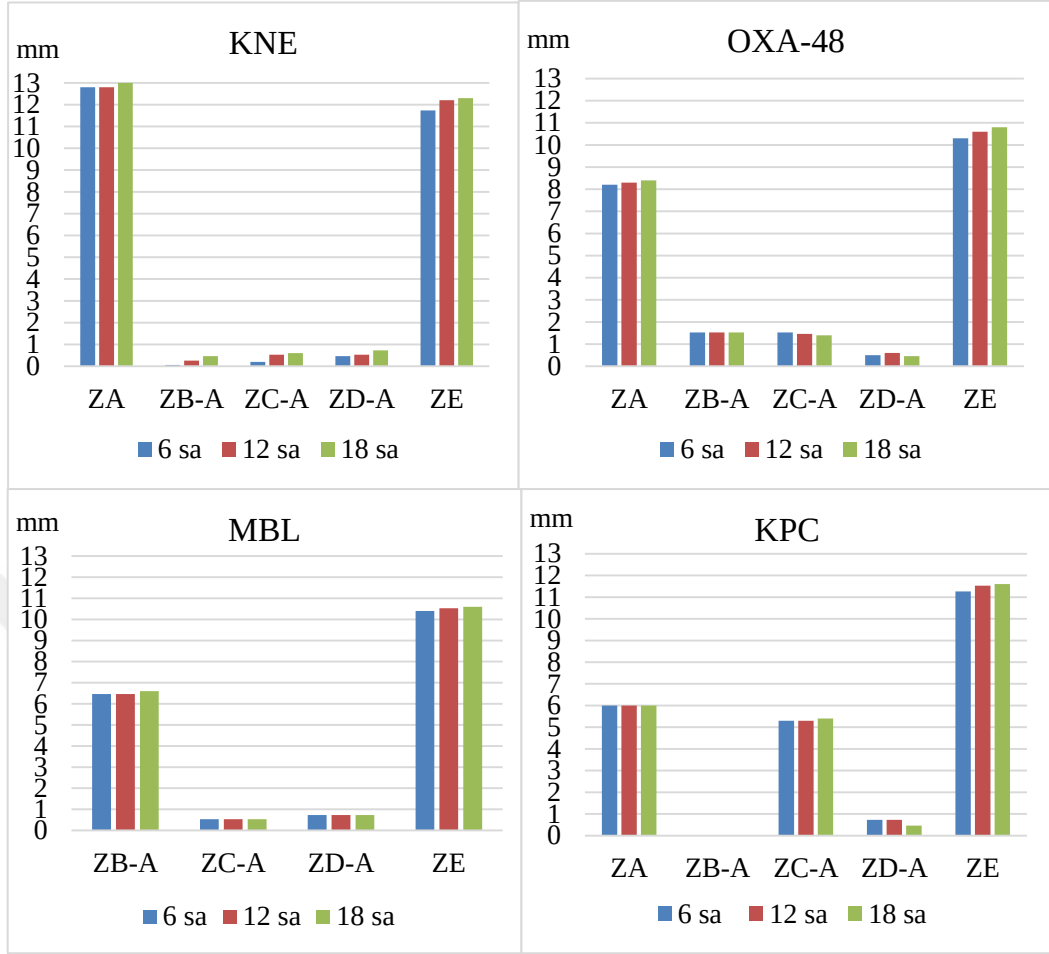
4.1.4. Validasyon Suşlarının dBLIMplus Bulguları

Validasyon gruplarına göre kombinasyon setinin her bir diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları ve ortalamaları ile zon çapı farklarının aralıkları ve ortalamaları Tablo 4.5'te ve Grafik 4.2'de gösterilmiştir. Buna göre her grup kendi içerisinde değerlendirildiğinde dBLIMplus sonuçları açısından incelendiğinde 6-12-18. saatler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği tespit edilmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.5. Validasyon gruplarına göre her bir kombinasyon disk seti diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm) ile zon çapı farklarının aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm)

Direnç geni	Süre (saat)	Zon çapı aralıkları (ortalamaları)					Zon çapı farklarının aralıkları (ortalamaları)		
		Z _A	Z _B	Z _C	Z _D	Z _E	Z _{B-A}	Z _{C-A}	Z _{D-A}
KNE (n=15)	6.	12-14 (12,8)	12-14 (12,7)	12-13 (12,8)	12-14 (13,2)	10-13 (11,7)	-1-1 (0,06)	-1-1 (0,2)	0-1 (0,46)
	12.	12-14 (12,8)	12-14 (13)	13-14 (13,2)	12-14 (13,3)	10-14 (12,2)	-1-2 (0,26)	-1-2 (0,53)	0-2 (0,53)
	18.	12-14 (13)	12-14 (13,4)	13-14 (13,5)	13-15 (13,8)	10-14 (12,3)	-1-2 (0,46)	-1-2 (0,6)	0-2 (0,73)
OXA-48 (n=15)	6.	6-11 (8,2)	6-11 (9,8)	6-12 (9,8)	6-11 (8,8)	9-11 (10,3)	0-4 (1,53)	0-3 (1,53)	-1-2 (0,5)
	12.	6-11 (8,3)	6-11 (9,8)	6-11 (9,8)	6-11 (8,8)	10-11 (10,6)	0-4 (1,53)	0-4 (1,46)	-1-3 (0,6)
	18.	6-11 (8,4)	6-11 (10)	6-12 (9,8)	6-12 (8,7)	10-11 (10,7)	0-4 (1,53)	0-3 (1,4)	-1-2 (0,46)
MBL (n=15)	6.	6 (6)	11-13 (12,4)	6-10 (6,5)	6-10 (6,7)	9-12 (10,4)	5-7 (6,46)	0-4 (0,53)	0-4 (0,73)
	12.	6 (6)	11-13 (12,4)	6-10 (6,5)	6-10 (6,7)	9-12 (10,5)	5-7 (6,46)	0-4 (0,53)	0-4 (0,73)
	18.	6 (6)	11-14 (12,6)	6-10 (6,5)	6-10 (6,7)	9-12 (10,6)	5-8 (6,6)	0-4 (0,53)	0-4 (0,73)
KPC (n=15)	6.	6 (6)	6 (6)	11-12 (11,3)	6-10 (6,7)	10-12 (11,2)	0 (0)	5-7 (5,3)	0-4 (0,73)
	12.	6 (6)	6 (6)	11-12 (11,3)	6-10 (6,7)	11-12 (11,5)	0 (0)	5-6 (5,3)	0-4 (0,73)
	18.	6 (6)	6 (6)	11-13 (11,4)	6-10 (6,4)	11-12 (11,6)	0 (0)	5-7 (5,4)	0-4 (0,46)

Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü; KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*

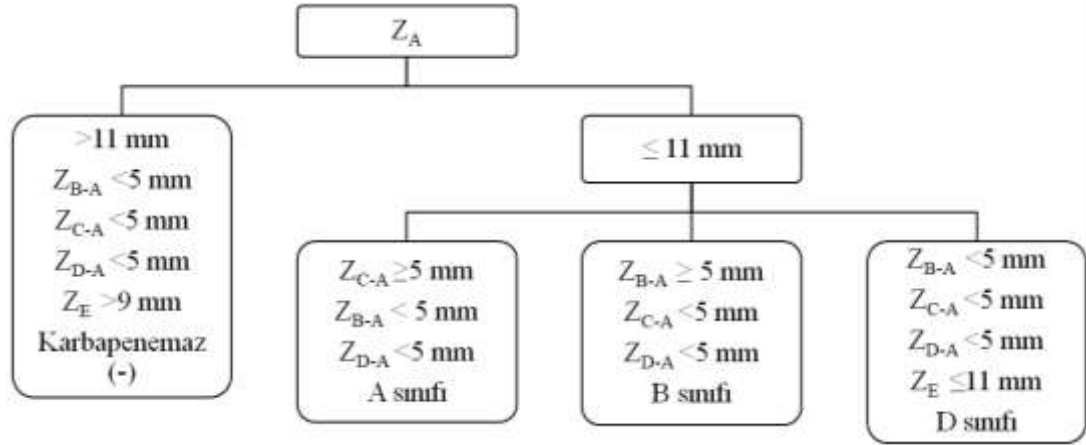


Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü

Grafik 4.2. Validasyon gruplarına göre kombinasyon setinin her bir diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı farklarının ortalamaları (mm) ve A ve E diskinin 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapının ortalamaları (mm)

4.1.5. Validasyon Verileri ile Belirlenen Değerlendirme Kriterleri

Validasyon suşları ile elde edilen inhibisyon zon çaplarına ve zon çapı farklarına göre dBLIMplus için değerlendirme kriterleri belirlenmiştir. Şekil 4.1’de değerlendirme kriterleri şema olarak gösterilmiştir.



Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü

Şekil 4.1. dBLIMplus değerlendirme kriterleri şeması

4.2. Klinik Suşların Özellikleri

Rutin laboratuvar uygulamaları sırasında klinik örneklerden izole edilen suşlarda karbapenemaz üretiminin belirlenmesi ve karakterizasyonu amacıyla dBLIMplus'ın kullanılabilirliğini değerlendirmek için hastanemizde yatmakta olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilmiş 100 adet *Enterobacterales* klinik suşu ile çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen klinik suşların 66 tanesi *K. pneumoniae* ve 34 tanesi *E. coli* izolatları idi. Suşların izole edildikleri örnek türü ve servislere göre dağılımları Tablo 4.6'da gösterilmiştir. Klinik suşlar da validasyon suşlarına benzer olarak en fazla kan ve idrar örneklerinden izole edilmiştir.

Tablo 4.6. Klinik çalışma suşlarının izole edildiği örnek türü ve servislere göre dağılımı [n (%)]

Servis	Örnek türü					Toplam
	Kan	İdrar	Yara	Balgam	TA	
Yoğun Bakım	41	8	2	-	4	55
Dahili	20	4	1	4	-	29
Cerrahi	5	4	5	1	1	16
Toplam	66	16	8	5	5	100

TA: Trakeal aspirat

4.2.1. Klinik Suşların Antibiyotik Duyarlılık Durumu

Karbapenemaz pozitif ve negatif klinik suşların BD Phoenix otomatize sistemi ile tespit edilen antibiyotik duyarlılık durumları Tablo 4.7’de verilmiştir. Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*’lerin en az duyarlı olduğu antibiyotikler seftazidim (%52,2), AMC (54,5) ve seftriakson (CRO) (56,8) iken, KPE’lerin tamamının karbapenemlere direnç yanında CRO, AMC ve piperasilin-tazobaktam da dirençli olduğu tespit edilmiştir. Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales*’lerin en duyarlı bulunduğu antibiyotikler ise sırasıyla COL (%62,5), gentamisin (%39,2) ve CZA (%32,1) olarak belirlenmiştir. Suşların karbapenemaz direnç genlerine göre antibiyotik duyarlılıkları değerlendirildiğinde antibiyotiklere en yüksek direnç OXA-48 pozitifliği bulunan suşlarda gözlenmiş (CZA ve COL hariç), KPC ve OXA-48 birlikte pozitif olan bir suşun ise sadece CZA ve COL’e duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.7. Karbapenemaz pozitif ve negatif klinik suşların antibiyotik duyarlılık durumları [n (%)]

Antibiyotik	KNE (n=44)	KPE (n=56)
AN	43 (97,7)	18 (32,1)
GN	38 (86,3)	22 (39,2)
ETP	44 (100)	0 (0)
IMP	44 (100)	0 (0)
MEM	44 (100)	0 (0)
CAZ	23 (52,2)	1 (1,7)
CRO	25 (56,8)	0 (0)
AMC	24 (54,5)	0 (0)
TZP	38 (86,3)	0 (0)
SXT	35 (79,5)	4 (7,1)
CİP	26 (59,1)	1 (1,7)
LEV	26 (59,1)	1 (1,7)
CZA	44 (100)	19 (33,9)
COL	44 (100)	35 (62,5)

AN: Amikasin; GN: Gentamisin; ETP: Ertapenem; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; CRO: Seftriakson; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; TZP: Piperasilin-tazobaktam; SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol; CİP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; CZA: Seftazidim-avibaktam; COL: Kolistin; KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*; KPE: Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales*

Tablo 4.8. Çeşitli karbapenemaz direnç genine sahip klinik suşların antibiyotik duyarlılık durumları (n)*

Antibiyotik	KPC (n=8)	KPC&OXA-48 (n=1)	OXA-48&NDM (n=31)	OXA-48 (n=16)
AN	8	0	8	2
GN	8	0	11	3
ETP	0	0	0	0
IMP	0	0	0	0
MEM	0	0	0	0
CAZ	0	0	0	1
CRO	0	0	0	0
AMC	0	0	0	0
TZP	0	0	0	0
SXT	3	0	0	1
CİP	0	0	0	1
LEV	0	0	0	1
CZA	3	1	0	15
COL	7	1	19	8

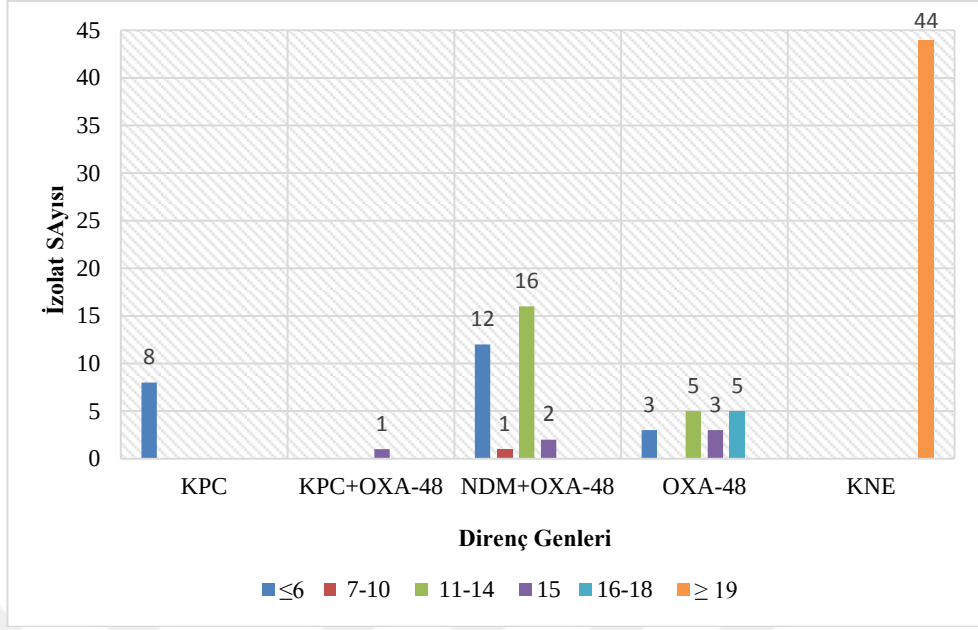
AN: Amikasin; GN: Gentamisin; ETP: Ertapenem; IMP: İmipenem; MEM: Meropenem; CAZ: Seftazidim; CRO: Seftriakson; AMC: Amoksisilin-klavulanik asit; TZP: Piperasilin-tazobaktam; SXT: Trimetoprim-sulfametoksazol; CİP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; CZA: Seftazidim-avibaktam; COL: Kolistin; KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*; KPE: Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales*

*Suş sayısı yetersiz olduğu için duyarlılık oranları verilmemiştir.

4.2.2. Klinik Suşların Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Bulguları

Klinik suşların mCIM sonuçları Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Karbapenemaz negatif klinik suşlarda MEM zon çapları 19-23 mm (ortalama 21,9) olup mCIM sonucu negatif olarak değerlendirilirken; OXA-48 pozitiflerde 6-18 mm (ortalama 13,2); NDM ve OXA-48 birlikte pozitiflerde 6-15 mm (ortalama 9,8); KPC pozitiflerin tamamında 6 mm olarak, KPC ve OXA-48 birlikte pozitif tek bir suş da ise 15 mm olarak ölçülmüş olup mCIM sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Tüm klinik suşların mCIM sonuçları altın standart olarak kabul edilen PZR ile uyumlu bulunmuştur.

Grafik 4.3’te klinik suşların mCIM ile belirlenen MEM zon çaplarının gruplara göre dağılımı görülmektedir.

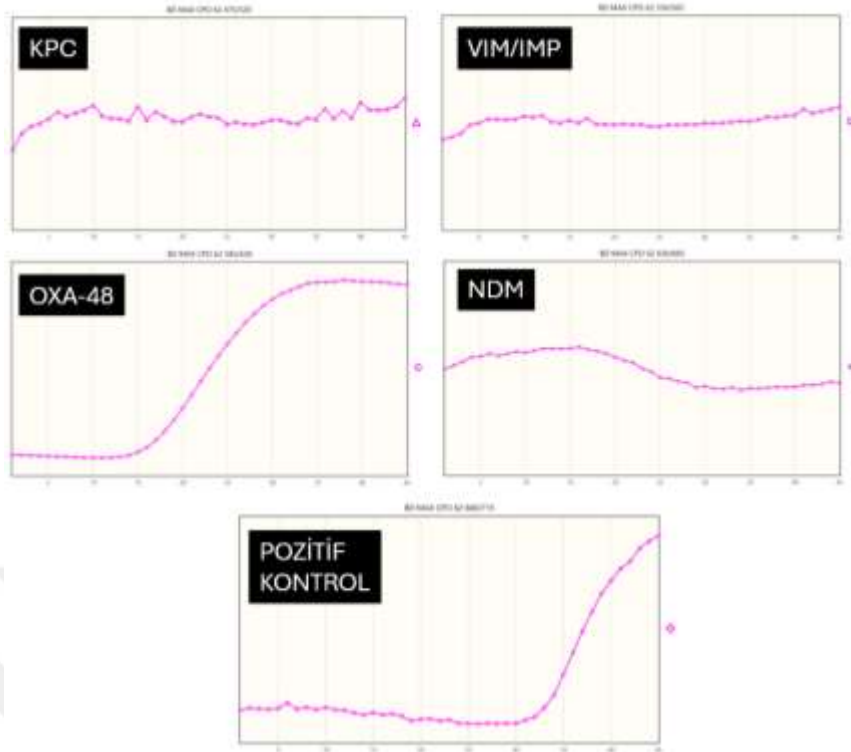


Grafik 4.3. Klinik suşların mCIM ile belirlenen meropenem zon çapları dağılımı

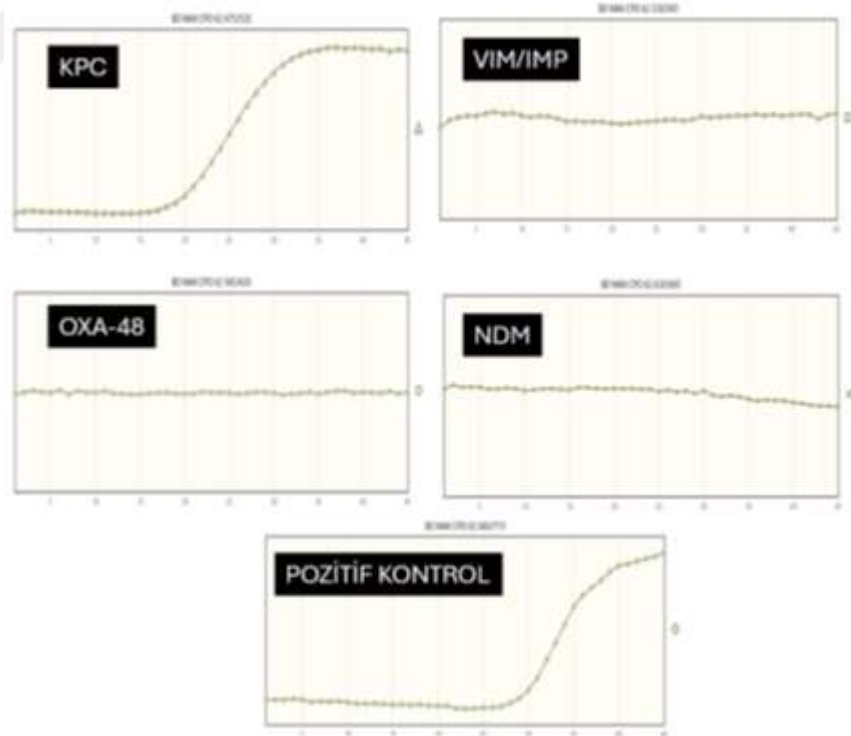
4.2.3. Klinik Suşların Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

Polimeraz zincir reaksiyonu ile klinik suşların 56'sı KPE olarak tespit edilmiş, sırasıyla 31 (%55,3)'i OXA-48 ve NDM birlikte, 16 (%28,5)'si OXA-48, 8 (%14,2)'i KPC, 1 (%1,7)'i KPC ve OXA-48 birlikte pozitif bulunmuş, 44'ü ise KNE olarak tespit edilmiştir.

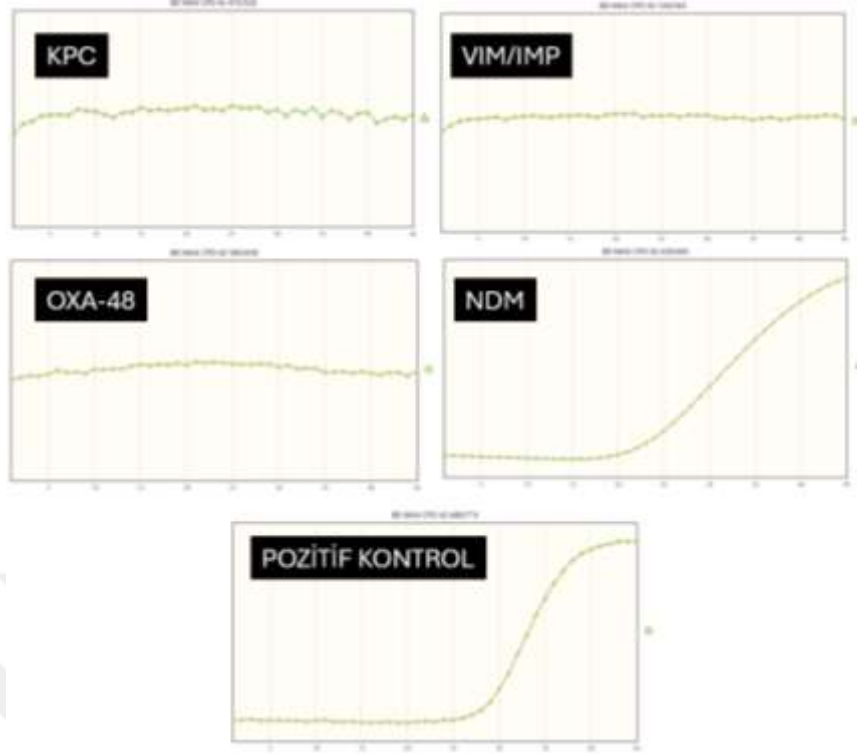
Klinik suşların Tablo 4.9'da BD MAXTM Check-Points CPO testi bulguları yer almaktadır. Karbapenemaz pozitif suşların çoğunluğunun birden fazla çeşit karbapenemaz direnç geni taşıdığı görülmektedir. Şekil 4.2-8'de sırasıyla OXA-48 pozitif, KPC pozitif, NDM pozitif, VIM/IMP pozitif, NDM ve OXA-48 birlikte pozitif, KPC ve OXA-48 birlikte pozitif ve karbapenemaz negatif suşların BD MAXTM Check-Points CPO testi sonuç örnekleri gösterilmiştir.



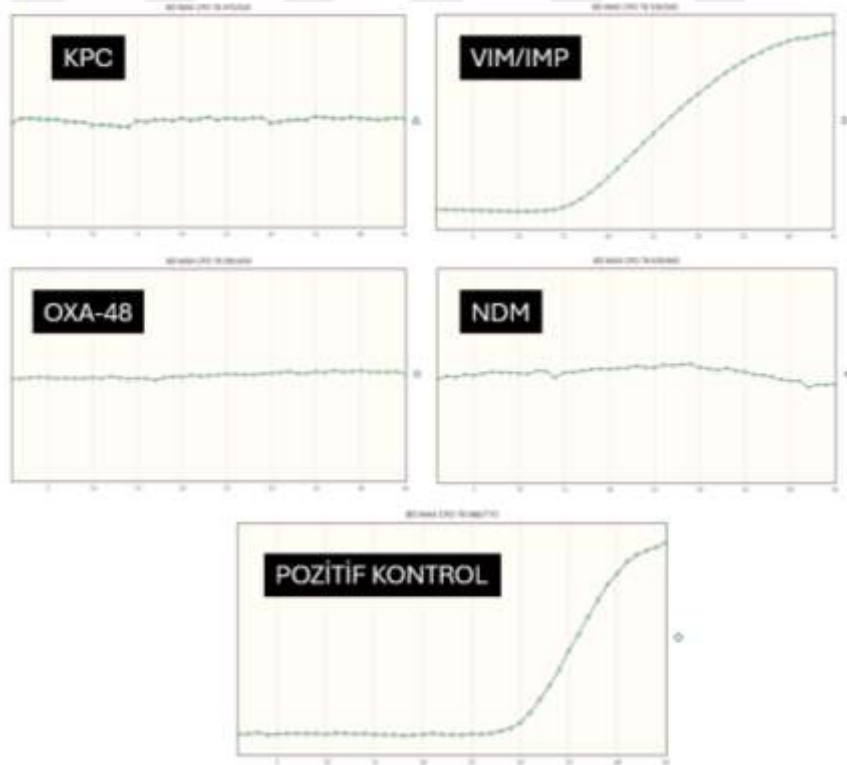
Şekil 4.2. OXA-48 pozitif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



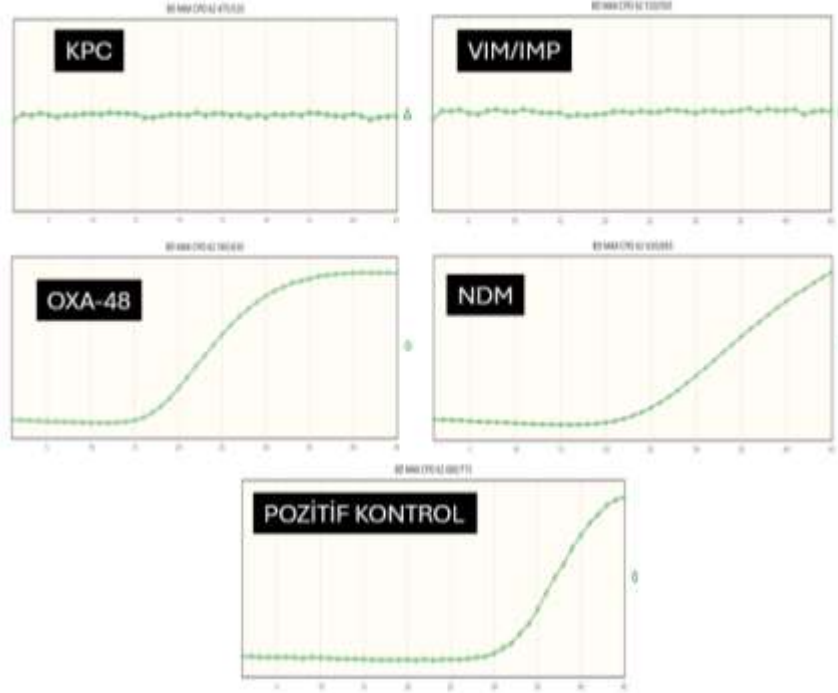
Şekil 4.3. KPC pozitif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



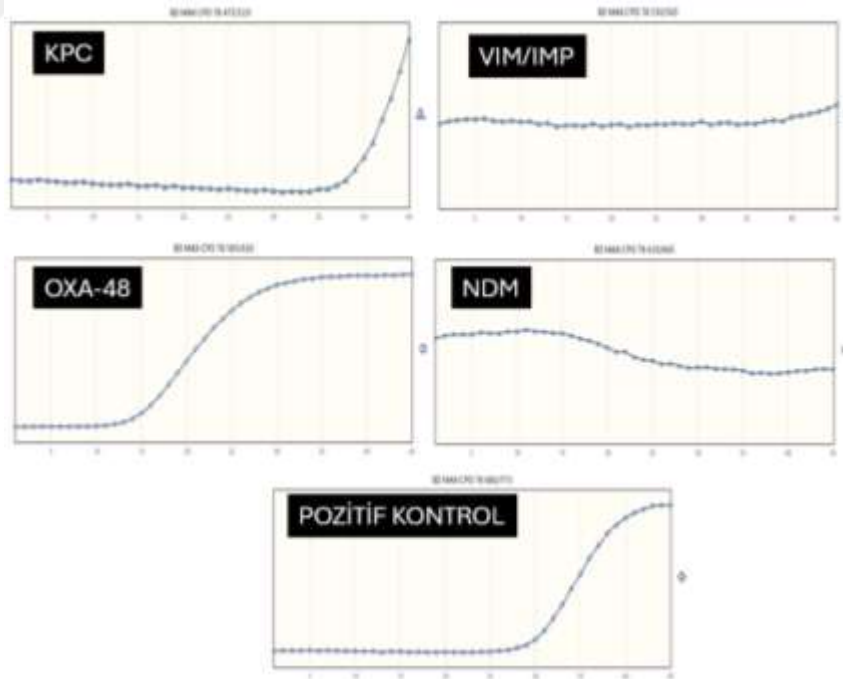
Şekil 4.4. NDM pozitif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



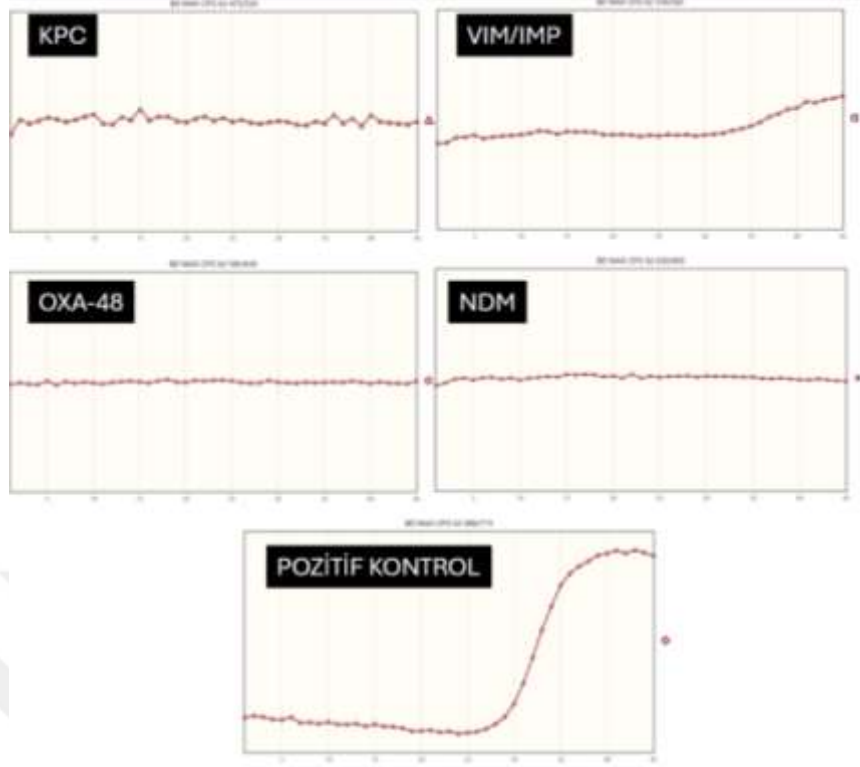
Şekil 4.5. VIM/IMP pozitif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



Şekil 4.6. NDM ve OXA-48 birlikte pozitif olan suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



Şekil 4.7. KPC ve OXA-48 birlikte pozitif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği



Şekil 4.8. Karbapenemaz negatif suşun BD MAX™ Check-Points CPO testi sonuç örneği

4.2.4. Klinik Suşların Kombinasyon Disk Testi Bulguları

Klinik suşların KDT sonuçları Tablo 4.9’da gösterilmiştir. Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu sonucuna göre karbapenemaz negatif olarak saptanan ve PZR ile direnç geni taşımadığı belirlenmiş olan 44 adet klinik suşun (K56-K100) tamamı KDT sonuçlarına göre de karbapenemaz negatif olarak bulunmuştur. Ayrıca 56 adet KPE suşunun 53’ünün (%94,6) KDT ile karbapenemaz aktivitesi tespit edilmiş, 3’ünde test ‘belirsiz’ olarak sonuçlanmıştır. Kombinasyon disk testi ile tek karbapenemaz sınıfı içeren 24 adet KPE suşunun 21 (%87,5)’inde karbapenemaz aktivitesi ve 19’unda (%79,1) doğru Ambler sınıfı belirlenirken, birden fazla karbapenemaz sınıfına sahip suşlar için ise karbapenemaz sınıflarından en az biri doğru olarak tespit edilmiştir. KDT’nin karbapenemaz karakterizasyonundaki duyarlılığı %91,7 (51/56), özgüllüğü %100 olarak belirlenmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile KPC geni taşıdığı belirlenen 8 adet klinik suşun KDT sonucuna göre 4’ü PZR ile tam uyumlu, 1’i OXA-48 pozitif (K7)

bulunmuşken, 3'ü belirsiz (K2, K5, K8) olarak değerlendirilmiştir. Kombinasyon disk testi sonucu belirsiz bulunan 3 suşun KDT bulguları dikkate alındığında üç suş için de KPC inhibitörlü disk ile (C diski) inhibisyon zonu oluştuğu ancak Z_{C-A} 'nın KPC olarak tanımlanabilecek genişlikte olmadığı görülmektedir. KPC ve OXA-48 geni birlikte pozitif saptanan bir izolatın (K9) ise KDT sonucu yalnızca KPC pozitif olarak tespit edilmiştir. Ayrıca A sınıfı karbapenemaz taşıyan 8 izolatın 3'ü (%37,5) (K1-K6-K7) TEM (E diski) dirençli bulunmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile OXA-48 ve NDM genini birlikte taşıdığı belirlenen 31 adet klinik suşun KDT sonucuna göre 18'i MBL pozitif, 13'ü OXA-48 pozitif olarak tespit edilmiştir. OXA-48 geni taşıdığı belirlenen 16 adet klinik suşun ise 1'i [K54 (KDT sonucuna göre MBL olarak sınıflanmıştır.)] hariç hepsi KDT sonucuna göre OXA-48 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda 56 KPE izolatının 49'unda (%87,5) TEM direnci tespit edilmiştir. OXA-48 pozitif 48 izolatın 46'sında (%95,8) TEM direnci saptanmıştır [29 (%60,4) NDM+OXA-48; 16 (%33,3) OXA-48; 1 (%2,1) KPC+OXA-48]. A sınıfı karbapenemaz tespiti için KDT'nin duyarlılığı %50 ve özgüllüğü %100; D sınıfı karbapenemaz tespiti için duyarlılığı %93,7 ve özgüllüğü %98,7 bulunmuştur.

Klinik suşlardan KDT sonucu belirsiz veya moleküler yöntemle belirlenen direnç geniyile uyumsuz tespit edilen K2, K5, K7, K8 ve K54 numaralı suşlar, D68C-MASTDISCS® Combi ESBL & AmpC disk seti ile de çalışılmış ve bu test ile de belirsiz sonuç elde edilmiştir. Ayrıca bu 5 adet klinik suşun 2. kez moleküler yöntem ile direnç genleri araştırılmış ve ilk sonuçları ile aynı sonuçlar elde edilmiştir.

KDT ve PZR ile belirlenen karbapenemaz sınıfları karşılaştırıldığında iki testin verileri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu tespit edilmiştir (Mc Nemar; $p=0,025$). Bununla birlikte, KDT ve PZR bulguları birbirleri ile uyumları açısından değerlendirildiğinde; bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından en az biri KDT ile tespit edilebildiğinde PZR ile uyumlu olarak değerlendirilse iki yöntemin bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı ve mükemmel uyum olduğu görülmekte iken ($\kappa=0,879$; $p<0,001$), bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarının tamamının KDT ile tespit edilebilmesi

koşulu ile KDT verileri PZR ile uyumlu olarak değerlendirildiğinde ise iki yöntemin bulguları arasında istatistiksel olarak anlamlı ancak düşük orta düzeyde bir uyum olduğu gözlenmiştir ($\kappa=0,291$; $p<0,001$).

4.2.5. Klinik Suşların dBLIMplus Bulguları

Çalışmaya alınan 100 klinik suşun dBLIMplus ile elde edilen sonuçları, mCIM, KDT ve PZR bulguları ile karşılaştırmalı olarak Tablo 4.9’da kombinasyon setinin her bir diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları ve ortalamaları ile zon çapı farklarının aralıkları ve ortalamaları ise PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz direnç genlerine göre sınıflandırılmış olarak Tablo 4.10’da ve Grafik 4.4’te verilmiştir. Belirlediğimiz değerlendirme kriterlerine göre hiçbir grupta yer almayan suş sonuçları ise ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilmiştir. ‘Belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilen suşlara 2. kez dBLIMplus uygulanmış, tekrar testlerde de aynı sonuç elde edilmiştir.

Klinik suşların A diski zon çapları KNE grubunda 12-14 mm aralığında (ortalama 13,25), KPE grubunda ise 6-11 mm aralığında (ortalama 6,76) ölçülmüş olup, dBLIMplus’ın KNE ve KPE belirleme duyarlılığı ve özgüllüğü %100 olarak saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile karbapenemaz negatif olarak saptanıp mCIM ve KDT ile de negatif bulunmuş olan 44 klinik suşun tamamı dBLIMplus ile de negatif olarak saptanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile bir ya da daha fazla karbapenemaz direnç geni tespit edilmiş olan 56 klinik suşun ise tamamı dBLIMplus ile karbapenemaz aktivitesi pozitif bulunmuş, bu suşların dBLIMplus ile karbapenemaz karakterizasyonu 6. saatte 52’sinde (%92,8), 12.-18. saatlerde 49’unda (%87,5) doğru yapılabilmektedir (Tablo 4.9). Tek bir karbapenemaz sınıfına ait direnç geni tespit edilen 24 klinik suşun 22’sinde (%91,6) dBLIMplus ile doğru Ambler sınıfı belirlenebilmiştir. Karbapenemaz karakterizasyonu açısından dBLIMplus’ın duyarlılığı ve özgüllüğü değerlendirildiğinde A sınıfı karbapenemazları tespit etmede duyarlılığı %87,5, özgüllüğü %100; D sınıfı karbapenemazları tespit etmede duyarlılığı %93,7, özgüllüğü %98,8 olarak bulunmuştur. Her grubun kendi içerisinde dBLIMplus bulguları PZR sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, 6.saatte aralarında anlamlı bir fark bulunmadığı ($p=0,125$), ancak 12-18. saatlerde aralarında anlamlı bir fark bulunduğu tespit edilmiştir (Mc Nemar; her biri $p<0,001$). dBLIMplus ve PZR

bulgularının birbirleri ile uyumları değerlendirildiğinde; bir izolatin PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından en az biri dBLIMplus ile tespit edilebildiğinde PZR ile uyumlu olarak değerlendirilse iki yöntemin bulguları istatistiksel olarak anlamlı ve mükemmel uyum bulunurken ($\kappa=0,920$; $p<0,001$), bir izolatin PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarının tamamının dBLIMplus ile tespit edilebilmesi koşulu ile dBLIMplus verileri PZR ile uyumlu olarak değerlendirildiğinde ise iki yöntemin bulguları arasında istatistiksel olarak düşük orta düzeyde bir uyum olduğu gözlenmiştir ($\kappa=0,363$; $p<0,001$).

dBLIMplus ile ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilen ve PZR ile uyumsuz bulunan suşların dBLIMplus testinde ölçülen 6.-12.-18. saatlerdeki zon çapları Tablo 4.11’de verilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile tek başına KPC pozitif bulunan 8 suşun 7’si dBLIMplus ile KPC pozitif, 1’i ise OXA-48 (K7) pozitif olarak tespit edilmiştir. K7 numaralı suşun KPC inhibitörlü disk (C disk) ile 6-12-18. saatlerde inhibisyon zonu oluşturduğu ancak Z_{C-A} ’nın dBLIMplus değerlendirme kriterlerine göre KPC olarak tanımlanabilecek genişlikte olmadığı görülmektedir.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile OXA-48 pozitif bulunan 16 suşun dBLIMplus ile 12’si tüm saatlerde OXA-48 pozitif olarak değerlendirilmiştir. K41 numaralı suş tüm saatlerde Z_E 12 mm olarak ölçülmüş ve dBLIMplus ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilmiştir. K42, K43 ve K44 numaralı suşlar 6. saatte Z_E 10 mm olarak ölçülmüş ve dBLIMplus sonucu OXA-48 pozitif olarak, 12. ve 18. saatlerde ise Z_E 12 mm olarak ölçülmüş ve dBLIMplus ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu ile KPC ve OXA-48 birlikte pozitif bulunan tek bir suş ise (K9) dBLIMplus ile OXA-48 pozitif olarak değerlendirilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile NDM ve OXA-48 birlikte pozitif 31 suşun dBLIMplus ile 22’si OXA-48 pozitif, 7’si MBL pozitif bulunurken K29 ve K30 numaralı 2 suшта Z_{B-A} ve $Z_{D-A} \geq 5$ mm bulunmuş, bu nedenle bu suşların dBLIMplus ile karbapenemaz kategorizasyonu ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilmiştir. Birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran 32 izolatin 30’unda (%93,7) en az bir karbapenemaz sınıfı dBLIMplus ile belirlenebilmiştir (Tablo 4.9).

Klinik suşların dBLIMplus ile standart KDT sonuçları karşılaştırıldığında 78 adet suşun (%78) dBLIMplus ile KDT sonuçlarının tam uyumlu bulunduğu tespit

edilmiştir. 3 suşun (K2, K5, K8) KPC pozitifliği dBLIMplus ile gösterilebilirken KDT ile ‘belirsiz sonuç’ bulunduğu tespit edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile KPC pozitif bulunduğu halde dBLIMplus ile OXA-48 pozitif olarak değerlendirilmiş olan K7 numaralı suş KDT ile de OXA-48 pozitif olarak değerlendirilmiştir. KPC ve OXA-48 birlikte pozitif K9 suşu dBLIMplus ile OXA-48 pozitif, KDT ile KPC pozitif olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.12). Polimeraz zincir reaksiyonu ile NDM ve OXA-48 birlikte pozitif bulunan 11 klinik suş (K11, K12, K13, K21, K22, K25, K27, K28, K34, K36, K38) hem dBLIMplus hem de KDT OXA-48 pozitif; 11 klinik suş (K14, K15, K17, K18, K19, K20, K23, K24, K26, K31, K32) KDT ile MBL pozitif, dBLIMplus ile OXA-48 pozitif olarak; 7 klinik suş (K10, K16, K33, K35, K37, K39, K40) hem dBLIMplus hem de KDT ile MBL pozitif olarak bulunurken; 2 klinik suş (K29, K30) KDT ile OXA-48 pozitif, dBLIMplus ile ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilmiştir. OXA-48 pozitif 14 klinik suş hem dBLIMplus hem de KDT ile OXA-48 pozitif olarak, 1 klinik suş (K41) KDT ile OXA-48 pozitif olarak değerlendirilirken, dBLIMplus ile ‘belirsiz sonuç’ olarak bulunmuştur. OXA-48 pozitif 1 suşun (K54) dBLIMplus ile OXA-48 pozitifliği tespit edilirken, KDT ile MBL pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.9).

Sırasıyla karbapenemaz negatif (Resim 4.1 A-B-C), OXA-48 pozitif (Resim 4.1 D-E-F), MBL pozitif (Resim 4.1 G-H-I) ve KPC pozitif (Resim 4.1 J-K-L) suşların 6-12-18. saatlerdeki dBLIMplus inhibisyon zon çapı örnekleri Resim 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Klinik suşların mCIM, KDT, PZR ve dBLIMplus bulguları

Suş No	mCIM	KDT	PZR	dBLIMplus (6. saat)	dBLIMplus (12-18. saat)
K1	Pozitif	KPC	KPC	KPC	KPC
K2	Pozitif	BELİRSİZ	KPC	KPC	KPC
K3	Pozitif	KPC	KPC	KPC	KPC
K4	Pozitif	KPC	KPC	KPC	KPC
K5	Pozitif	BELİRSİZ	KPC	KPC	KPC
K6	Pozitif	KPC	KPC	KPC	KPC
K7	Pozitif	OXA-48	KPC	OXA-48	OXA-48
K8	Pozitif	BELİRSİZ	KPC	KPC	KPC
K9	Pozitif	KPC	KPC+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K10	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K11	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K12	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K13	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K14	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K15	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K16	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K17	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K18	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K19	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K20	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K21	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K22	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K23	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K24	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K25	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K26	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K27	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K28	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K29	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	BELİRSİZ	BELİRSİZ
K30	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	BELİRSİZ	BELİRSİZ
K31	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K32	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K33	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K34	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K35	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K36	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-4	OXA-48	OXA-48
K37	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K38	Pozitif	OXA-48	NDM+OXA-48	OXA-48	OXA-48
K39	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K40	Pozitif	MBL	NDM+OXA-48	MBL	MBL
K41	Pozitif	OXA-48	OXA-48	BELİRSİZ	BELİRSİZ
K42	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	BELİRSİZ
K43	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	BELİRSİZ
K44	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	BELİRSİZ
K45	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K46	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K47	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K48	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K49	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K50	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48

Tablo 4.9. Klinik suşların mCIM, KDT, PZR ve dBLIMplus bulguları (Devamı)

Suş No	mCIM	KDT	PZR	dBLIMplus (6. saat)	dBLIMplus (12-18. saat)
K51	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K52	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K53	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K54	Pozitif	MBL	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K55	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K56	Pozitif	OXA-48	OXA-48	OXA-48	OXA-48
K57	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K58	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K59	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K60	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K61	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K62	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K63	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K64	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K65	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K66	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K67	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K68	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K69	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K70	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K71	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K72	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K73	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K74	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K75	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K76	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K77	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K78	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K79	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K80	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K81	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K82	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K83	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K84	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K85	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K86	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K87	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K88	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K89	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K90	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K91	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K92	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K93	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K94	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K95	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K96	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K97	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K98	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K99	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif
K100	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif

Tablo 4.10. Klinik suşların direnç genlerine göre her bir kombinasyon disk seti diski ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapı aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm) ile zon çapı farklarının aralıkları (mm) ve ortalamaları (mm)

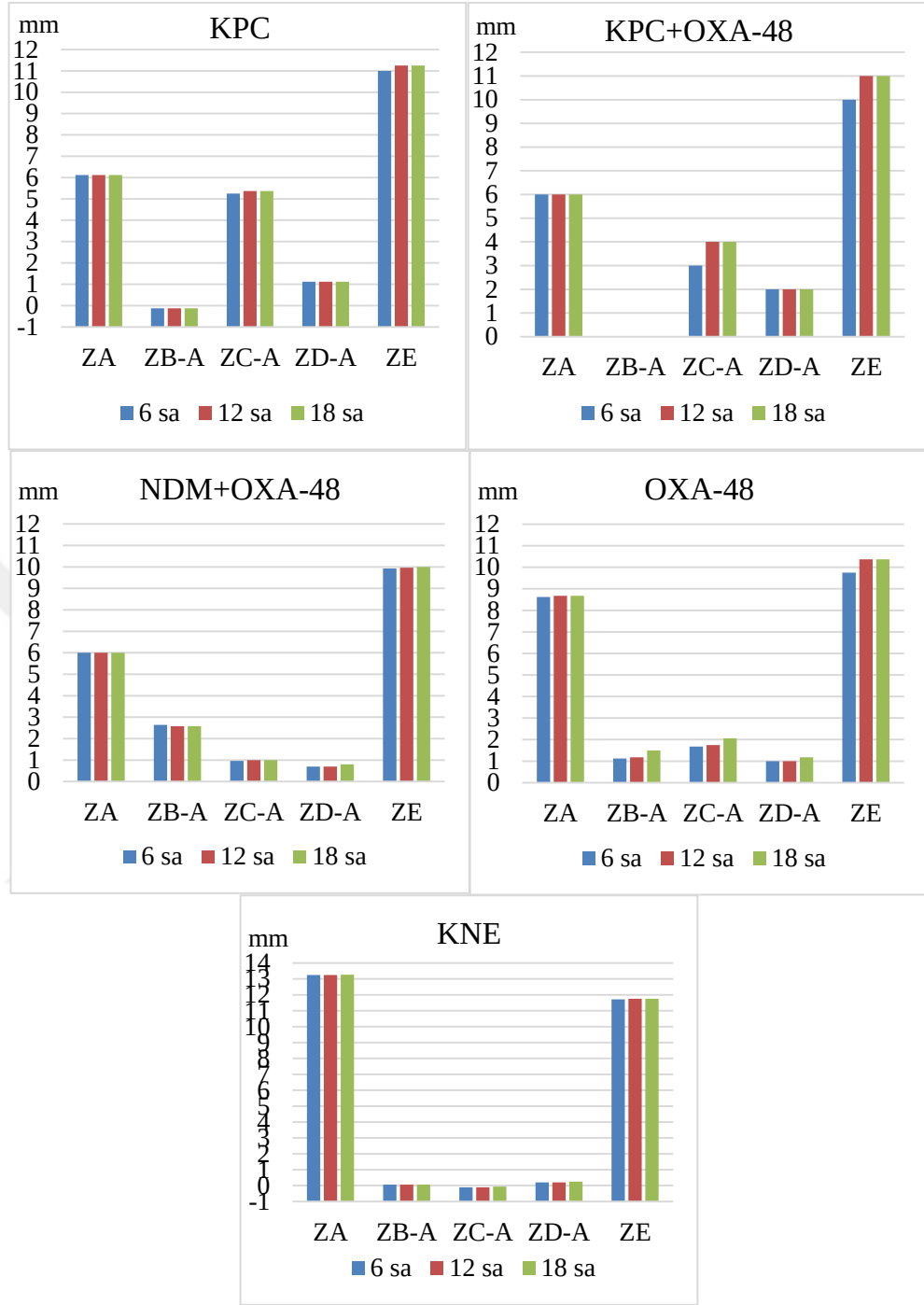
Direnç geni	Süre (saat)	Zon çapı aralıkları (ortalamaları)					Zon çapı farklarının aralıkları (ortalamaları)		
		Z _A	Z _B	Z _C	Z _D	Z _E	Z _{B-A}	Z _{C-A}	Z _{D-A}
KPC (n=8)	6.	6-7 (6,1)	6 (6)	9-13 (11,3)	6-11 (7,2)	8-12 (11)	-1-0 (-0,1)	3-7 (5,2)	0-4 (1,1)
	12.	6-7 (6,1)	6 (6)	9-13 (11,5)	6-11 (7,2)	8-13 (11,2)	-1-0 (-0,1)	3-7 (5,3)	0-4 (1,1)
	18.	6-7 (6,1)	6 (6)	9-13 (11,5)	6-11 (7,2)	8-13 (11,2)	-1-0 (-0,1)	3-7 (5,3)	0-4 (1,1)
KPC+ OXA-48 (n=1)	6.	6 (6)	6 (6)	9 (9)	8 (8)	10 (10)	0 (0)	3 (3)	2 (2)
	12.	6 (6)	6 (6)	10 (10)	8 (8)	11 (11)	0 (0)	4 (4)	2 (2)
	18.	6 (6)	6 (6)	10 (10)	8 (8)	11 (11)	0 (0)	4 (4)	2 (2)
NDM+ OXA-48 (n=31)	6.	6 (6)	6-13 (8,6)	6-10 (6,9)	6-12 (6,7)	8-12 (9,9)	0-7 (2,6)	0-4 (0,9)	0-6 (0,7)
	12.	6 (6)	6-13 (8,5)	6-10 (7)	6-12 (6,8)	8-12 (9,9)	0-7 (2,5)	0-4 (1)	0-6 (0,7)
	18.	6 (6)	6-13 (8,5)	6-10 (7)	6-12 (6,8)	8-12 (10)	0-7 (2,5)	0-4 (1)	0-6 (0,8)
OXA-48 (n=16)	6.	6-11 (8,6)	6-12 (9,7)	6-12 (10,3)	6-12 (9,6)	9-12 (9,7)	0-2 (1,1)	0-4 (1,6)	0-3 (1)
	12.	6-11 (8,6)	6-12 (9,8)	6-12 (10,4)	6-12 (9,6)	9-12 (10,3)	0-2 (1,1)	0-4 (1,7)	0-3 (1)
	18.	6-11 (8,6)	6-12 (10,1)	6-12 (10,7)	6-13 (9,8)	9-12 (10,3)	0-4 (1,5)	0-4 (2,1)	0-3 (1,1)
KNE (n=44)	6.	12-14 (13,2)	12-15 (13,3)	12-14 (13,1)	11-15 (13,4)	10-12 (11,7)	0-1 (0,1)	-1-0 (-0,1)	0-1 (0,2)
	12.	12-14 (13,2)	12-15 (13,3)	12-14 (13,1)	11-15 (13,4)	10-12 (11,7)	0-1 (0,1)	-1-0 (-0,1)	0-1 (0,2)
	18.	12-14 (13,2)	12-15 (13,3)	12-14 (13,2)	11-15 (13,5)	10-12 (11,7)	0-1 (0,1)	-1-1 (-0,1)	0-1 (0,2)

Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü; KNE: Karbapenemaz negatif *Enterobacterales*

Tablo 4.11. dBLIMplus ile ‘belirsiz sonuç’ olarak değerlendirilen ve PZR ile uyumsuz bulunan suşların dBLIMplus testinde ölçülen 6.-12.-18. saatlerdeki zon çapları (mm)

Suş No	Süre	Z _A	Z _B	Z _C	Z _D	Z _E
K7	6. saat	6	6	9	6	10
	12. saat	6	6	9	6	11
	18. saat	6	6	9	6	11
K29	6. saat	6	12	10	12	9
	12. saat	6	12	10	12	9
	18. saat	6	12	10	12	9
K30	6. saat	6	12	6	12	9
	12. saat	6	12	6	12	9
	18. saat	6	12	6	12	9
K41	6. saat	10	11	12	12	12
	12. saat	10	11	12	12	12
	18. saat	10	11	12	12	12
K42	6. saat	10	11	12	12	10
	12. saat	11	12	12	12	12
	18. saat	11	12	12	13	12
K43	6. saat	10	11	11	10	10
	12. saat	10	11	12	10	12
	18. saat	10	12	12	10	12
K44	6. saat	9	9	11	11	10
	12. saat	9	10	11	11	12
	18. saat	9	10	11	11	12

Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü



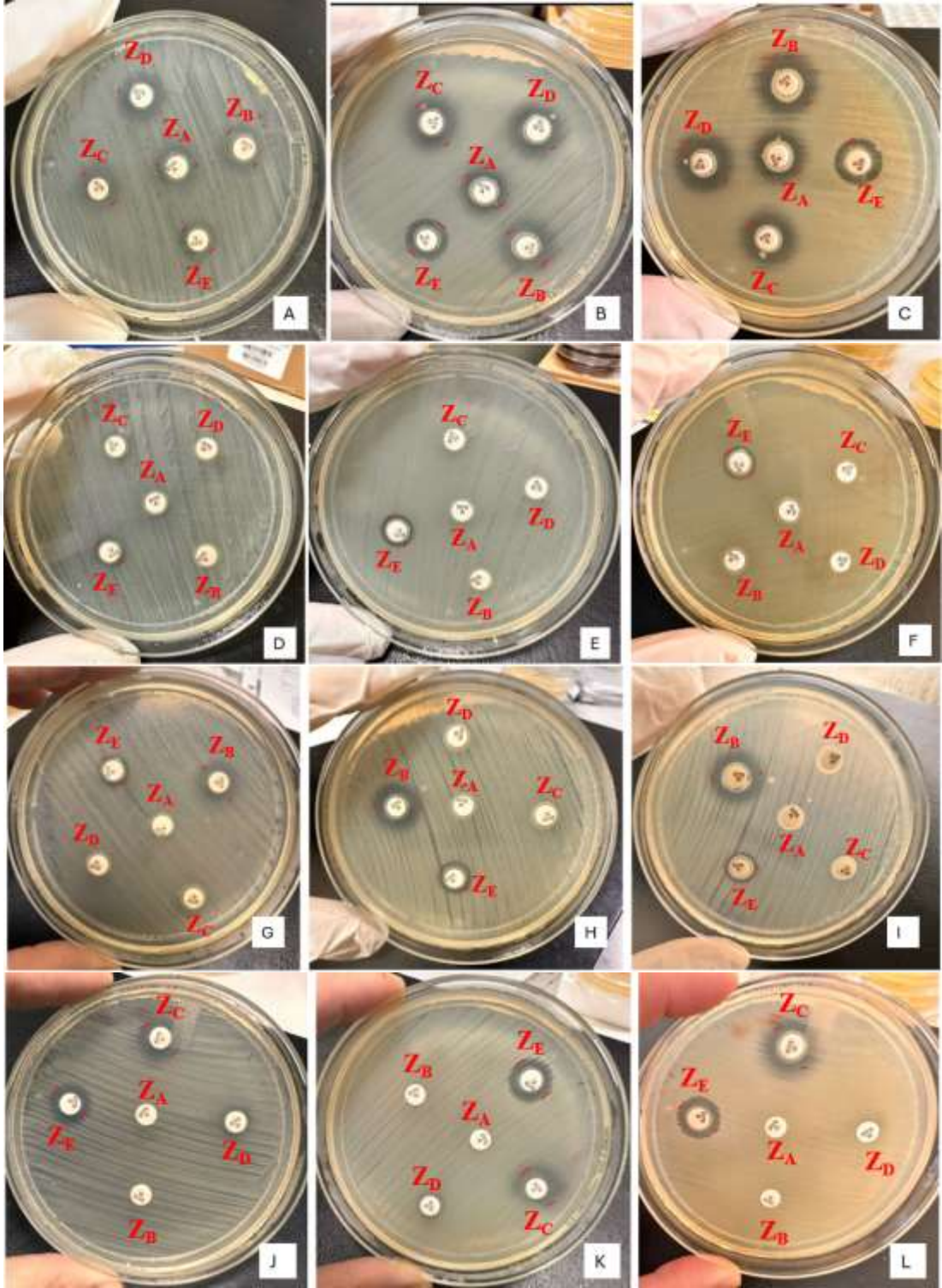
Z: Zon Çapı; A: Penem 10 µg; B: Penem 10 µg + MBL inhibitörü; C: Penem 10 µg + KPC inhibitörü; D: Penem 10 µg + AmpC inhibitörü; E: TEM + MBL inhibitörü

Grafik 4.4. Klinik suşların direnç genlerine göre sınıflandırılmış olarak kombinasyon setinin diskleri ile 6-12-18. saatlerde ölçülen zon çapları ve zon çapı farklarının ortalamaları (mm)

Tablo 4.12. Klinik suşların dBLIMplus ve KDT bulgularının karşılaştırması (n)

PZR	dBLIMplus					KDT				
	KPC	MBL	OXA-48	BS	KNE	KPC	MBL	OXA-48	BS	KNE
KPC (n=8)	7	-	1	-	-	4	-	1	3	-
KPC+OXA-48 (n=1)	-	-	1	-	-	1	-	-	-	-
NDM+OXA-48 (n=31)	-	7	22	2	-	-	18	13	-	-
OXA-48 (n=16)	-	-	15	1	-	-	1	15	-	-
KNE (n=44)	-	-	-	-	44	-	-	-	-	44

BS: Belirsiz sonuç



Resim 4.1. Sırasıyla karbapenemaz negatif suşun (A-B-C), OXA-48 pozitif suşun (D-E-F), MBL pozitif suşun (G-H-I), KPC pozitif suşun (J-K-L) 6-12-18. saatlerde dBLIMplus inhibisyon zon çapları

5. TARTIŞMA

Karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'in yayılım potansiyeli ve neden olduğu salgınlara ilişkin çok sayıda rapor KPE'nin ve KDE'nin erken tespit edilmesinin önemini vurgulamaktadır. Ulusal ve uluslararası antimikrobiyal sörveyans programları, dirençli patojenlerin takibinde ve yayılmalarının kontrolünde önemli bir rol oynamaktadır. Bu tür programlar ile elde edilen veriler, yerel tedavi kararlarını yönlendirmek, klinisyenleri bilgilendirmek, patojenlerin yayılımını önleyebilmek ve dirençli patojenlere yönelik yeni antimikrobiyal geliştirebilmek için yol gösterici olmaktadır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi KDE'nin daha fazla yayılımının önlenmesinde ve enfeksiyon kontrolünde yüksek standartlara duyulan ihtiyacı vurgulamıştır (119). Bu amaçla tüm dünyada karbapenemazların yaygınlığı ve dağılımı hakkında bilgi sağlayacak ve KDE epidemiyolojisi ile ilişkili risk faktörlerinin anlaşılmasına katkıda bulunacak birçok araştırma ağı oluşturulmuştur.

Avrupa'da EuSCAPE'in 2013-2014 yıllarını kapsayan araştırmasında Türkiye'den karbapenem dirençli 124 adet *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatların 98'inde (%79) OXA-48 en sık tespit edilen karbapenemaz türü olmuştur ve 9'unda (%7) NDM pozitifliği bildirilmiştir (89). 2018 yılında EURGen-Net'e bağlı KPE epidemiyolojik evre araştırmasında 2015'te olduğu gibi 2018'de de ülkemiz endemik durum bildiren ülkeler arasında yer almıştır. ATLAS raporunda ise KDE izolatlarının oranları 2018'de %4,7'den, 2022'de %12,9'a önemli ölçüde arttığı bildirilmiştir. Avrupa'da CAESAR ve EARS-Net 2021 yılı Türkiye verilerine göre incelenen *E. coli* izolatlarının %4,7'sinde, *K. pneumoniae* izolatlarının ise %49,1'inde karbapenem direnci tespit edilmiş ve bu rapora göre 2017-2021 yıllarında Türkiye'de KDE izolatlarının sayısının artış gösterdiği bildirilmiştir.

Alp ve ark., Şubat 2010-Aralık 2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada rektal sürüntü örneklerinde KDE araştırmışlar ve PZR ile 94 izolatın 86'sında (%91,5) OXA-48 pozitifliği saptamışlardır (120). Iraz ve ark., Haziran 2012-Mart 2013 yılları arasında yaptıkları çalışmada otomatize sistem ile karbapenem grubu antibiyotiklere karşı azalmış duyarlılık gösteren 37 adet *K. pneumoniae* izolatının %98'inin karbapenemaz geni taşıdığını belirlemiş, 32'sinde (%86) OXA-48 ve

7'sinde (%19) NDM-1 pozitifliği tespit etmişlerdir (121). Hastanemizde Çiftçi ve ark., Ağustos 2012-Mayıs 2014 yılları arasında otomatize sistem ile karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 47 adet *K. pneumoniae* izolatının PZR ile 17'sinde (%36) OXA-48, 6'sında (%13) NDM, 8'inde (%17) OXA-48 ve NDM birlikte pozitif olarak saptamış, 16 (%34) suşta ise ticari kit ile araştırılan genlerden herhangi birini (KPC, OXA-48 ve NDM) tespit etmediklerini bildirmişlerdir (122). Demiray ve ark., 2014-2016 yılları arasında 64 adet karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatını incelemişler, 59'unda (%92,1) karbapenemaz geni tespit etmişler ve sırasıyla 27'sinde (%45,7) NDM-1, 20'sinde (%33,8) NDM-1 ve OXA-48 birlikte, 11'inde (%18,6) OXA-48 ve 1'inde (%1,6) KPC pozitifliği saptamışlardır (123). Tekintaş ve ark., 2015-2016 yılları arasında karbapenemlerden en az birine dirençli 54 adet *K. pneumoniae* izolatında karbapenemaz aktivitesini ve türünü incelemişler ve sırasıyla PZR ile 33'ünde (%61,1) OXA-48, 19'unda (%35,1) NDM ve OXA-48 birlikte, 2'sinde (%3,7) NDM pozitifliği saptamışlardır (124). Genç ve ark., Ocak 2015-Şubat 2017 yılları arasında otomatize sistemle en az bir karbapeneme yüksek dozda duyarlı veya dirençli olduğu belirlenmiş 100 adet *K. pneumoniae* izolatında karbapenemaz genlerini araştırmışlar ve sırasıyla OXA-48 pozitif 51 (%52,6), OXA-48 ve NDM birlikte pozitif 25 (%26,3), NDM pozitif 9 (%9,4), KPC pozitif 6 (%6,3), NDM ve KPC birlikte pozitif 2 (%2,1), OXA-48 ve KPC birlikte pozitif 1 (%1), NDM ve VIM birlikte pozitif 1 (%1) adet olmak üzere toplamda 95 adet KPE izolatı ve 5 adet KNE izolatı tespit etmişlerdir (125). Hastanemizde Köle ve ark., Ocak 2018-Şubat 2020 yılları arasında otomatize sistem ile karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 42 adet *K. pneumoniae* izolatını inceledikleri çalışmalarında PZR ile 34 (%81) OXA-48, 5 (%11,9) OXA-48 ve NDM birlikte, 3 (%7,1) OXA-48 ve KPC birlikte pozitif izolat tespit etmişlerdir (126). Süzük Yıldız ve ark., 01 Mart-30 Eylül 2019 tarihleri arasında Türkiye'de farklı bölgelerdeki 26 hastaneden EURGen-Net ağına dahil edilen toplam 493 adet *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarını incelemişler, 207'sinde (%41,9) moleküler yöntemle karbapenemaz direnç genleri tespit etmişlerdir. Bu araştırma sonucunda OXA-48 pozitif 108 (%52,2); KPC pozitif 34 (%16,4); NDM-1 pozitif 31 (%15); OXA-48 ve NDM-1 birlikte pozitif 26 (%12,6); KPC ve NDM-1 birlikte pozitif 6 (%2,8); VIM pozitif 1 (%0,5); OXA-48 ve VIM birlikte pozitif 1 (%0,5) izolat

tespit edilmiştir (127). Telli, 2012-2020 yılları arasında toplam 3.899 *K. pneumoniae* izolatında karbapenem direncini ve karbapenemaz direnç genlerini araştırmıştır. İzolatların 291'inde (%7,5) karbapenem direnci saptanmış ve sırasıyla OXA-48 ve NDM birlikte pozitif 123 (%42,2), OXA-48 pozitif 113 (%38,8), NDM pozitif 32 (%11), KPC pozitif 7 (%2,4), VIM pozitif 5 (%1,7), OXA-48 ve KPC birlikte pozitif 2 (%0,6), OXA-48 ve VIM birlikte pozitif 1 (%0,3), NDM ve KPC birlikte pozitif 1 (%0,3), NDM ve IMP birlikte pozitif 1 (%0,3) adet olmak üzere toplam 285 KPE izolatı (%97,9) tespit etmiştir (128). Çalık ve ark., Aralık 2020-Ağustos 2021 tarihleri arasında karbapenemlerden en az ikisine dirençli 102 ve karbapenemlere duyarlı 50 olmak üzere toplamda 152 *Enterobacterales* izolatını incelemişlerdir. 92 izolatta KPE saptamışlar ve sırasıyla 43'ünde (%46,7) NDM ve OXA-48 birlikte, 39'unda (%42,4) OXA-48, 7'sinde (%7,6) KPC, 2'sinde (%2,2) NDM, 1'inde (%1,1) KPC ve OXA-48 birlikte pozitif tespit etmişlerdir (129). Ülkemizdeki ve dünyadaki çalışmalardaki verilerle uyumlu olarak çalışmamızda da en fazla OXA-48 geni (%85,7) saptanmış ve en sık olarak NDM ve OXA-48 birlikteliği (%55,3) tespit edilmiştir.

Karbapenemaz pozitif *Enterobacterales* izolatları salgınlara neden olan hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli patojenleridir; bu nedenle, klinik laboratuvarlarda KPE'lerin duyarlılığı yüksek testlerle daha hızlı belirlenmesi, enfeksiyon önleme ve kontrolü için kritik öneme sahiptir. Klinik laboratuvarların KPE'yi ve karbapenemaz genini belirleyebilmek için kullanabileceği birçok test CLSI ve EUCAST kılavuzlarında yer almaktadır. Bu testler kullanılarak karbapenemaz varlığının araştırıldığı birçok çalışma bulunmaktadır.

Tekintaş ve ark., 54 adet KPE izolatına MASTDISCS™ seti ile KDT uygulamışlar, tümünde PZR sonuçları ile uyumlu sonuç elde etmişlerdir (124). Çakar ve ark., 2013-2014 yılları arasındaki çalışmada 155 adet KPE izolatının KDT'sini KPC/MBL ve OXA-48 Doğrulama Kiti (Rosco, Danimarka) ile çalışmışlar ve tüm izolatların sonucunu PZR ile uyumlu bulmuşlardır (130). Zhang ve ark., 247 adet KDE izolatıyla yaptıkları çalışmalarında 233'ünü (%94,3) KPE olarak bulmuşlar ve ayrıca KDT ile PZR'yi %94 oranında (231/247) uyumlu bulmuşlardır. Karbapenemaz tespitinde KDT'nin düşük özgüllüğünü (%79) 3 izolatın yanlış pozitif sonuç vermesiyle ilişkilendirmişlerdir. Yanlış negatif sonuç elde edilen 9 suşun

6'sının IMP pozitif olduğu ve bu durumun KDT'nin MBL tespitindeki düşük duyarlılığını (%88) açıkladığını bildirmişlerdir. Serin karbapenemazların tespitinde KDT'nin duyarlılığını %93'ün üzerinde saptamışlardır (131). Hu ve ark., 77 adet KPE izolatında MASTDISCS® Combi Carba Plus ile karbapenemaz tespitinin duyarlılığını ve özgülüğünü sırasıyla KPC pozitiflerde %82,3 ve %100; MBL pozitiflerde %100 ve %97,1; OXA-48 pozitiflerde %100 ve %99,4 olarak bulmuşlardır. Testin MBL'ler için negatif prediktif değerin %84,2 ile düşük kaldığını tespit etmişler ve testin MBL'leri saptamak için validasyonunun geliştirilmesinin gerekli olduğunu bildirmişlerdir. Pozitif prediktif değeri OXA-48 pozitifler için %80 olarak tespit etmişler, TEM direncinin OXA-48 pozitifliği dışında da olabileceğini ve bu durumun yanlış pozitif sonuçlara yol açabileceğini vurgulamışlardır (132). Diğer taraftan Çiftçi ve ark. hastanemizde karbapenem dirençli 47 *K. pneumoniae* izolatında karbapenemaz varlığını ve karbapenem direnç mekanizmalarını fenotipik doğrulayıcı testler ve PZR ile araştırmış, PZR ile direnç geni tespit edilmiş 31 KPE izolatının 29'unda (%93,5) MHT ile karbapenemaz aktivitesi saptandığını, D70C karbapenemaz tanı seti (MAST Diagnostics) ile ise ancak %21,4'ünün tespit edilebildiğini, fenotipik doğrulayıcı testlerin karbapenemaz aktivitesinin varlığını tespit etmek için en kullanışlı yöntem olarak ileri sürülemeyeceğini bildirmişlerdir (122).

Sattler ve ark., MASTDISCS® Combi Carba Plus D73C (MAST-KDT), KPC/MBL ve OXA-48 Doğrulama Kiti (Rosco, Danimarka) (ROS-KDT) ve KPC&MBL&OXA-48 disk kiti (Liofilchem, İtalya) (LİO-KDT) olmak üzere toplamda 3 ticari kit ile 153 adet izolatın karbapenemaz aktivitesini araştırdıkları çalışmışlarında LİO-KDT ile 106 KPE'nin 102'sini (%96), MAST-KDT ve ROS-KDT ile ise 91'ini (%86) saptamışlardır. Ayrıca 47 KNE'nin MAST-KDT ve ROS-KDT ile 46'sını (%97,8), LİO-KDT ile ise 41'ini (%87,2) negatif olarak sınıflandırmışlardır (133). Bizim çalışmamızda ise bu bulgulara benzer şekilde MAST-KDT ile 56 KPE'nin 53'ünde (%94,6) karbapenemaz aktivitesi tespit edilmiş ve 44 KNE izolatının hepsi (%100) KDT ile de karbapenemaz negatif sınıflandırılmıştır. Sattler ve ark., tek karbapenemaz içeren 103 adet KPE izolatının MAST-KDT ile 88'ini (%85), ROS-KDT ile 86'sını (%84) ve LİO-KDT ile 99'unu (%96) doğru Ambler sınıfında belirlemişlerdir (133). Bizim çalışmamızda tek

karbapenemaz sınıfı içeren 24 adet KPE izolatının 19'unda (%79,1) MAST-KDT ile doğru Ambler sınıfı belirlendi. Bu oran Sattler ve ark.'larının tespit ettiği orandan düşüktü ve bu durumun tek karbapenemaz direnç mekanizması içeren suş sayımızın görece azlığından ve A sınıfı karbapenemaz içeren suşlar ile testin duyarlılığının düşük olmasından kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Sattler ve ark., D sınıfı karbapenemazların tanımlanmasında TEM diskinin duyarlılığını MAST-KDT için %96, ROS-KDT ve LİO-KDT için %100 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca A veya B sınıfı karbapenemazlar dahil tüm izolatların %13'ünde (MAST-KDT), %30'unda (ROS-KDT) ve %70'inde (LİO-KDT) TEM direnci saptamışlardır (133). Çalışmamızda 56 adet KPE izolatının 49'unda (%87,5), yalnızca A sınıfı karbapenemaz taşıyan 8 izolatın ise 3'ünde (%37,5) TEM direnci tespit edilmiştir. Bu nedenle tüm ticari firmalar tarafından önerildiği gibi, D sınıfı karbapenemaz tespitinde yanlış pozitif sonuçlardan kaçınmak amacıyla, TEM sonuçları, yalnızca A veya B sınıfı karbapenemazlar için herhangi bir sinerji gözlenmediğinde yorumlanmalıdır.

Çeşitli ticari marka kombinasyon disk setlerinin farklı Ambler sınıf karbapenemazları tespit etmede farklı duyarlılık ve özgüllük sergilediğini bildiren birçok çalışma bulunmaktadır. Sattler ve ark., MAST-KDT A sınıfı karbapenemazların %66'sını, B sınıfı karbapenemazların %94'ünü ve D sınıfı karbapenemazların %92'sini; ROS-KDT A sınıfı karbapenemazların %100'ünü, B sınıfı karbapenemazların %67'sini ve D sınıfı karbapenemazların %96'sını; LİO-KDT ile A sınıfı karbapenemazların %97'sini, B sınıfı karbapenemazların %94'ünü ve D sınıfı karbapenemazların %100'ünü doğru bir şekilde tespit edebilmişlerdir (133). Taha ve ark., 2021-2022 yılları arasında MASTDISCS® Combi Carba Plus'ın 80 adet *Klebsiella* spp. izolatında duyarlılığını ve özgüllüğünü KPC pozitifler için %55,5 ve %98,6, MBL pozitifler için %93,5 ve %66,6, OXA-48 pozitifler için %79,3 ve %100; 20 adet *E. coli* izolatında duyarlılığını ve özgüllüğünü KPC pozitifler için %64,7 ve %100, MBL pozitifler için %95 ve %0, OXA-48 pozitifler için %47,3 ve %100 olarak bulmuşlardır (134). Genç ve ark., hem manuel olarak hazırladıkları kombinasyon disklerini hem de ticari kombinasyon disk setini (Mastdiscs combi-D70C) kullanarak 140 adet KPE'de KDT uygulamışlar ve KDT'nin duyarlılığını ve özgüllüğünü manuel hazırlanan diskler ile sırasıyla %85 ve

%73 olarak, ticari diskler ile sırasıyla %100 ve %100 olarak bulmuşlardır. Manuel hazırlanan kombinasyon diskleri kullanılarak yapılan KDT’de OXA-48 pozitif izolatlarda 21 yanlış sonuç (%19) tespit etmişlerdir (125). Li ve ark., 2017-2018 yılları arasında 79 KPE izolatına KDT uyguladıkları çalışmalarında, test için 3 ayrı MEM diskinin birine 10 µl PBA, birine 10 µl EDTA damlatmış bir disk ise inhibitörsüz olarak kullanılmıştır. Çalışmalarında KDT’nin duyarlılık ve özgüllüğünü A sınıfı karbapenemazlar için %95 ve %98,4; B sınıfı karbapenemazlar için ise %97,6 ve %100 olarak bulmuşlardır (135). Çalışmamızda KDT’nin KPE tespitindeki duyarlılığı %91,7, özgüllüğü ise %100 olarak; A sınıfı karbapenemaz tespiti için duyarlılığı %50 ve özgüllüğü %100 olarak; D sınıfı karbapenemaz tespiti için duyarlılığı %93,7 ve özgüllüğü %98,7 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından en az biri KDT ile tespit edilebildiğinde PZR ile uyumlu olarak değerlendirildiğinde KDT’nin PZR ile mükemmel uyumlu olduğu, bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından tamamı KDT ile tespit edilebildiğinde KDT’nin PZR ile düşük orta düzeyde uyumlu olduğu görülmüştür. Kombinasyon disk testleri ile yapılan değerlendirmelerde her bir izolat için ancak tek bir direnç mekanizması tespit edilebiliyor olması bu testin prosedürüne özgü bir kısıtlama olmakla birlikte çalışmamızda birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran 32 izolatın KDT ile tamamında en az bir karbapenemaz sınıfı doğru olarak belirlenebilmiştir. Bizim çalışmamızda MASTDISCS® Combi Carba Plus tanı seti ile KPE tespitindeki duyarlılık ve özgüllük diğer çalışmalardaki bulgulara benzer şekilde %90’ın üzerinde bulunurken, A sınıfı karbapenemazların tespitinde daha düşük duyarlılık oranı tespit edilmiş olması Sattler ve ark. ve Taha ve ark.’nın bulguları ile benzer bulunmuştur. Çalışmamızdaki A sınıfı karbapenemaz taşıyan izolat sayısının görece az olması da KDT’nin A sınıfı karbapenemaz tespitinde düşük duyarlılığının sebebi olarak ileri sürülebilir. Ohsaki ve ark., 23 KPE ve 21 KNE izolatı ile yaptıkları çalışmalarında MASTDISCS Combi Carba Plus’ın karbapenemaz tespitindeki duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlardır. Ancak KDT’leri yorumlarken $Z_{B-A} \geq 5\text{mm}$ ve $Z_E \leq 10\text{ mm}$ ise hem MBL hem OXA-48 pozitif olarak sınıflandırmışlardır (136). Birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran izolatları bu şekilde değerlendirdikleri için testin duyarlılık ve özgüllüğünü bizim çalışmamız ve benzer çalışmalardan daha

yüksek bulmuşlardır. Bu nedenle fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllüğünün bildirildiği çalışmalar değerlendirilirken çalışmada kullanılan metodoloji ve yorumlama kriterlerinin dikkate alınmasının gerekliliği göz ardı edilmemelidir.

Yapılan çalışmalar ile valide edilmiş yöntem olması, enzim sınıflandırılmasını sağlaması ve hazır ticari disklerin temin edilebilmesi nedeniyle KDT avantajlı bir yöntemdir. Bununla birlikte sonuçları değerlendirmek için 18 saatlik bir sürenin olması pratikte daha hızlı testlerin geliştirilmesini gerektirmiştir. Nordmann ve ark., bakteri süspansiyonundan santrifüjle geri kazanılan bakteri ekstraktlarından karbapenemaz üreten etkenleri 2 saatten daha kısa bir sürede tanımlayabilecek kolorimetrik tabanlı CarbaNP testini geliştirmişler ve 162 adet KPE izolatlarının tümünde karbapenemaz aktivitesini tespit edebilmişlerdir. Doğrudan klinik örneklerden elde edilen bakteri kolonisinden CarbaNP testi kullanılabilirse karbapenemaz tespit etme süresinin daha da kısalacağını vurgulayarak ileri çalışmalara öncü olmuşlardır (137).

Tijet ve ark., 100 adet KPE ve 82 adet KNE izolatında CarbaNP testinin duyarlılığını %90,1, özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlardır. 7 adet OXA pozitif, 3 adet MBL pozitif (mukoid) ve 1 adet KPC pozitif (mukoid) izolatı yanlış negatif saptadıklarını, CarbaNP'nin iyi bir özgüllük ve kısa sürede sonuç vermesine rağmen KPE'nin yaklaşık %10'unu (çoğu OXA-48) tespit edemediklerini bildirmişlerdir (138). Yamada ve ark., 33 adet KPE ve 23 adet KNE izolatında CarbaNP testinin hiçbirinde yanlış pozitif sonuç vermediğini, ancak 2 adet MBL (biri mukoid) ve 2 adet OXA pozitif izolatta yanlış negatif sonuç verdiğini bildirmişlerdir (139). Pasteran ve ark., CarbaNP testini ve CarbaNP testini doğrudan (CarbaNP-direkt) bakteri kolonisinden 161 adet karbapenemaz pozitif ve 105 adet karbapenemaz negatif Gram negatif bakteri izolatı üzerinde denemişlerdir. Testlerin karbapenemaz tespitinde genel duyarlılıkları ve özgüllükleri sırasıyla CarbaNP için %84 ve %100; CarbaNP-direkt için ise %98 ve %100 olarak bulunmuştur. CarbaNP ve CarbaNP-direkt testlerinin karbapenemaz tespitindeki duyarlılıkları sırasıyla A sınıfı karbapenemazlar için %89 ve %100; B sınıfı karbapenemazlar için %80 ve %98; D sınıfı karbapenemazlar için %83 ve %94 olarak bulunmuştur. CarbaNP-direkt'in CarbaNP'a göre karbapenemaz tespitinde daha yüksek duyarlılık gösterdiği, KPC ve NDM'yi ise OXA-48'e göre daha yüksek duyarlılıkla tespit ettiği görülmüştür (100).

CarbaNP-direkt sonuçları kısa sürede elde edilebildiğinden enfeksiyonların hızlı bir şekilde önlenmesi ve kontrolü için alternatif bir test olabilir. Ancak mukoid ve/veya OXA pozitif izolatlarda duyarlılığı düşüktür. Ayrıca %3-5 kadar renk değişiminde şüphede kalındığı durumlar olması sebebiyle yorumlanamadığı durumlar olduğu unutulmamalıdır.

Bianco ve ark., 130 adet *Enterobacterales* (100 KPE, 30 KNE) izolatında NG-Test Carba 5 testini pozitif kan kültüründen doğrudan ve bakteri kolonisinden gerçekleştirerek karbapenemaz tespitindeki performansını değerlendirmişler ve her iki yöntemle testin duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla OXA-48 pozitif, MBL pozitif ve CZA duyarlı KPC pozitif izolatlar için %100 ve %100; CZA dirençli KPC izolatları için ise %78,6 ve %100 olarak bulmuşlardır (140). Zhang ve ark., 247 adet KDE izolatında (233'ü KPE) karbapenemaz tespitinde NG-Test Carba 5'in duyarlılığını %97, özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır (131). Choquet ve ark., 36 KPE ve 49 KNE izolatında karbapenemaz tespiti için MALDI-TOF MS'in duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ve %94 olarak bulmuşlardır (141). Lateral akım testleri ve MALDI-TOF MS yüksek duyarlılık sergileyen ve kısa sürede sonuç veren avantajlı testlerdir; ancak bu yöntemler pahalıdır, hassas reaktifler ve deneyimli personel gerektirmesi de önemli dezavantajlarıdır.

Karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'in tespit edilebilmesi için kullanılan KDT'nin 18 saatlik bir sonuçlanma süresinin olması, CarbaNP ve NG-Test Carba 5 testlerinin özel reaktifler gerektirmesi, MALDI-TOF MS ve genotipik testlerin pahalı olması nedeniyle karbapenemaz tespitini daha hızlı ve maliyet etkin yapabilmek için yeni yöntemler geliştirilip değerlendirilmiştir. Van der Zwaluw ve ark., tarafından karbapenemaz aktivitesinin tespiti için tanımlanan CIM, kolay uygulanabilmesi, maliyet etkin olmasıyla karbapenemaz taraması için tercih edilen bir yöntemdir. Ancak bazı araştırmacılar testin duyarlılığındaki farklılıkları bildirmişler ve yöntemin standardize edilmesi için ileri çalışmalar yapılarak CIM testi modifiye edilmiştir (103). Pierce ve ark., CIM'in bir çeşidi olan mCIM'i tanımlamışlar ve mCIM'i valide ettikten sonra rutin laboratuvar uygulamasındaki performansını değerlendirerek mCIM'in duyarlılığını %97 ve özgüllüğünü %99 olarak bildirmişlerdir (104). Çalık ve ark., karbapenemaz aktivitesi saptadıkları 92 izolatın tümünde mCIM pozitif, karbapenemaz sapmadıkları 50 izolatın tümünde ise mCIM

negatif olarak saptamışlar ve çalışmalarında mCIM'in duyarlılığı ve özgüllüğünü %100 olarak bildirmişlerdir (129). Modifiye CIM, duyarlılığı yüksek, ucuz ve kolay uygulanabilir bir testtir ancak MBL'leri serin karbapenemazlardan ayırt edemez. Yeni beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının (ör., CZA) çoğu serin karbapenemaza karşı etkili, ancak MBL'lere karşı etkili değildir. Ayrıca yeni antimikrobiyaller için duyarlılık testleri her laboratuvarda yaygın olarak kullanılmayabilir ve her laboratuvarın PZR testine erişimi olmayabilir. Bu nedenle Sfeir ve ark. tarafından MBL'lerin serin karbapenemazlardan ayırt edilmesini sağlayacak mCIM yönteminin bir çeşidi olan eCIM tanımlanmıştır. Çalışmalarında 41 adet KPE ve 34 adet KNE izolatında mCIM'in ve eCIM'in duyarlılığını ve özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlar ve eCIM testinin sınırlamasını hem serin hem de MBL enzimlerini barındıran izolatlarda serin ve MBL karbapenemaz üretimi ayrımının yapılamaması olarak bildirmişlerdir (17). Zhang ve ark., karbapenemaz tespitinde mCIM/eCIM'in PZR ile %95 oranında uyumlu olduğunu tespit etmişlerdir. Karbapenemaz tespitinde mCIM/eCIM'in duyarlılığını ve özgüllüğünü sırasıyla serin karbapenemazlar için %96 ve %97; MBL'ler için %93 ve %99 olarak bulmuşlardır. Serin karbapenemazlardaki MBL'ye göre düşük özgüllüğün 7 adet OXA-23 pozitif suşun 5'inin mCIM/eCIM ile yanlış negatif sonuç alınmış olmasından kaynaklandığını bildirmişlerdir (131). Jing ve ark., 2018 yılında yaptıkları çalışmalarında mCIM'in bir modifikasyonu olarak basitleştirilmiş CIM (sCIM)'i tanımlayıp değerlendirmişlerdir. Bakteri süspansiyonu ile MEM diskinin inkübasyonu yerine sCIM'de IMP diskinin bir yüzü doğrudan test edilen bakteri kolonisi ile kaplanır ve *Enterobacterales* için 0,5 McFarland standardında *E. coli* ATCC 25922 referans suşu yayılmış MHA plağına IMP diskinin bakteri kaplanan yüzü besiyerine gelecek şekilde yerleştirilir ve 16-18 saat inkübe edilir. 147 adet KPE ve 49 adet KNE izolatında uygulanan sCIM'in duyarlılığı %100, özgüllüğü %97,9 bulunmuştur. sCIM'in uygulanmasının ve sonuçların değerlendirilmesinin kolay olduğu ve mCIM ile tam uyum göstermesi ile karbapenemaz tespitinde kullanılabileceği ileri sürülmüştür (142). Jing ve ark., 2019 yılında hızlı karbapenemaz tespit yöntemini (rCDM) tanımlayıp değerlendirmişlerdir. rCDM'de test edilecek bakteri kolonisi doğrudan IMP diskinin bir yüzüne kaplanır ve *Enterobacterales* için 3,0 McFarland standardında *E. coli* ATCC 25922 referans suşu

ekilmiş ince MHA'ya (3 mm) IMP diskinin bakteri kaplanan yüzü besiyerine gelecek şekilde yerleştirilir ve 5-6 saat inkübe edilir. 200 adet KPE ve 57 adet KNE izolatında uygulanan rCDM'in duyarlılığı %100, özgüllüğü %99,6 olarak bulunmuştur (1 adet CTX-M pozitif *K. pneumoniae* yanlış pozitif). *Enterobacterales* izolatlarında rCDM, mCIM ve sCIM sonuçları tam uyumlu bulunmuştur. Araştırmacılar rCDM'nin uygulanmasının ve sonuçların değerlendirilmesinin kolay olduğunu ve sCIM ve mCIM'den daha kısa sürede 5-6 saatte sonuç elde edilmesi nedeniyle klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir (143). Meier ve ark., 2019 yılında CIM tabanlı doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden gerçekleştirilen kan kültürü CIM (bcCIM) testini tanımlayıp, değerlendirmişlerdir. Pozitif kan kültürü şişelerinden 1 ml kan kültürü sıvısı içine 10 µl, 10 mM ZnSO₄ ve MEM diski eklemişler ve CIM protokollerini aynen uygulamışlardır. 104 adet KPE ve 81 adet KNE izolatında uyguladıkları bcCIM'in duyarlılığı ve özgüllüğünü %100 olarak bulmuşlardır. bcCIM'de doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinde CIM ve benzer modifikasyon testlerinden 1 gün önce sonuç elde edilmesi ile karbapenemaz tespitinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir (144).

EUCAST'ın kan kültürlerinden antibiyotik direncinin erken tespiti için bildirdiği hızlı antimikrobiyal duyarlılık testi (HADT) ile *K. pneumoniae* veya *E. coli* için 4-6-8 saat içinde karbapenem direnci tespit edilebilmektedir (145). Ayrıca EUCAST, doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden HADT uygulanarak *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında direnç mekanizmalarının tespitine yönelik yayınladığı kılavuzda karbapenemaz aktivitesinin tespitine de yer vermiştir. HADT ile 6, 8, 16-20. saatlerde karbapenemaz aktivitesinin tespit edilebildiğini ve karbapenemaz aktivitesi taraması pozitif çıkan suşların doğrulamasının ve tiplendirmesinin yapılması gerektiğini bildirmişlerdir (146). dBLIMplus ile HADT'tan farklı olarak 6 saatte karbapenemaz aktivitesinin yanında karakterizasyonunun da yapılabilmesi antibiyotik tedavisinin yönlendirilmesine ek katkı sağlayacaktır. Bu verilere dayanarak dBLIMplus, rutin laboratuvar uygulamasında HADT ile birlikte tercih edilebilecek, uygulaması kolay yeni bir yöntem olarak ileri sürülebilir.

Enfeksiyona yol açan izolatın sahip olduğu karbapenemaz türüne göre tedavi seçenekleri değişiklik göstermektedir ve bundan dolayı karbapenemaz türünün belirlenmesi önem arz etmektedir. Bazı araştırmacılar CIM'e, kloksasilin, PBA ve sodyum-merkaptoasetat gibi beta-laktamaz inhibitörleri eklenerek karbapenemaz türlerini tespit etmek için de modifiye edilebileceğini önermişler ve karbapenemaz türünü erken belirleyecek yeni yöntemler geliştirip, değerlendirmişlerdir. Caméléna ve ark., 2018 yılındaki çalışmalarında karbapenemaz varlığını 8 saatte, Ambler sınıflamasına göre karbapenemaz karakterizasyonunu 20 saatte belirleyen CIM tabanlı yeni bir test olan CIMplus testini değerlendirmişlerdir. CIMplus'ta CIM'den farklı olarak bakteri süspansiyonu içine atılan MEM diski ile eş zamanlı 0,5 McFarland standardında *E. coli* ATCC 25922 referans suşu MHA'ya ekilip, eş zamanlı inkübasyona bırakılmıştır. Eş zamanlı karbapenemaz karakterizasyonu amacıyla 2 ayrı bakteri süspansiyonu daha hazırlanmıştır ve bunlara MEM diskleriyle birlikte inhibitör solüsyonlar da eklenmiştir (birine EDTA, diğerine PBA). 92 adet KPE ve 18 adet KNE izolatında uygulanan CIMplus testinin karbapenemaz aktivitesini tespit etmedeki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla 8. saatte %95,7 ve %94,4, 20. saatte %97,8 ve %94,4 olarak bulunmuştur. A ve D sınıfı karbapenemaza sahip tüm izolatlar CIMplus ile 8 ve 20. saatte tespit edilmiştir, ancak CIMplus ile 8 saatte 34 adet B sınıfı KPE izolatından 4'ü (2 adet VIM ve 2 adet NDM pozitif) tespit edilememiş ve 2'si 20 saatte KNE olarak saptanmıştır (2 hipermukoid VIM üreten *K. pneumoniae* izolatı). Ayrıca bir izolat yanlış pozitif saptanmıştır (CTX-M üreten *K. pneumoniae* izolatı). Tek bir karbapenemaz sınıfı barındıran, CIMplus ile KPE olarak belirlenen 88 izolatın %98,9'unun karbapenemaz karakterizasyonu CIMplus ile belirlenebilmiştir. Karbapenemaz karakterizasyonunda A, B ve D sınıfı izolatları için CIMplus'ın duyarlılığı sırasıyla %100, %96,9 ve %100 olarak bulunmuştur (147). Petit ve ark., 2020 yılında yaptıkları çalışmalarında karbapenemaz aktivitesini 8 saat içinde tespit edebilen ve 20 saat içinde Ambler sınıflandırmasına göre karbapenemaz türünü karakterize edebilen daha hızlı yeni bir mCIM tabanlı test olan mCIMplus'ı tanımlayıp değerlendirmişlerdir. mCIMplus'ta mCIM'den farklı olarak bakteri süspansiyonu içine atılan MEM diski ile eş zamanlı 0,5 McFarland standardında *E. coli* ATCC 25922 referans suşu MHA'ya ekilip eş zamanlı inkübasyona bırakılmıştır. Eş zamanlı karbapenemaz karakterizasyonu

amacıyla 2 ayrı bakteri süspansiyonu daha hazırlanmış ve bunlara MEM diskleriyle birlikte inhibitör solüsyonlar da eklenmiştir. 137 adet KPE ve 22 adet KNE izolatına uygulanan mCIMplus testinin karbapenemaz aktivitesini tespit etmedeki duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla 8. saatte %99,3 ve %100, 20. saatte %98,5 ve %100 olarak bulunmuştur. Hem 8. hem de 20. saatte 1 adet hipermukoid VIM üreten *K. pneumoniae* suşu KNE olarak, 1 adet GES üreten *Enterobacter* spp. izolatı 8. saatte KPE, 20. saatte KNE olarak sınıflandırılmıştır. Tek bir karbapenemaz sınıfı barındıran, mCIMplus ile KPE olarak belirlenen 129 izolatın %98,4'ünün karbapenemaz karakterizasyonu mCIMplus ile belirlenebilmiştir. Herhangi bir izolat yanlış karakterize edilmemiş ve iki suş belirsiz olarak saptanmıştır. A, B ve D sınıflarının tanımlanması için mCIMplus testinin duyarlılığı sırasıyla %100, %95, %100 olarak, özgüllüğü ise tüm sınıflar için %100 olarak belirlenmiştir (7). Çalışmamızda dBLIMplus ile PZR uyumsuz bulunan veya dBLIMplus ile 'belirsiz sonuç' alınan herhangi bir suş hipermukoid olarak tespit edilmemiştir.

Bianco ve ark. 2020 yılında karbapenemaz veya GSBL üreten *Enterobacterales*'i 6 saatte doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden tespit edebilen dBLIM'ı tanımlamışlardır. dBLIM validasyonunu yapmışlar ve 422 adet *Enterobacterales* izolatında dBLIM'in kullanılabilirliğini değerlendirmişlerdir. Aerobik ve anaerobik kan kültürü şişelerinden karbapenemaz üreten 162 adet izolatı tespit etmede dBLIM'in duyarlılığı sırasıyla KPC için %99 ve %99, OXA-48 için %100 ve %100, NDM için %100 ve %100, VIM için ise %100 ve %53,6 olarak bulunmuştur. Sonuçta dBLIM'in %98,3 duyarlılık ve %100 özgüllükle karbapenemaz aktivitesinin tespitinde kullanılabileceği belirtilmiş, ancak karbapenemaz karakterizasyonunun yapılamaması çalışmanın sınırlılığı olarak bildirilmiştir (19). Çalışmamızda dBLIMplus'ın karbapenemaz aktivitesini tespit etmedeki duyarlılığının benzer şekilde yüksek olduğu bulunmuştur.

Bianco ve ark. 2021 yılında serin karbapenemazları veya MBL'leri veya GSBL üreten *Enterobacterales*'i 6 saatte doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden tespit edebilen dBLIM'in bir çeşidi olan doğrudan EDTA ile modifiye edilmiş beta-laktam inaktivasyon yöntemini (deBLIM) tanımlamışlardır. Karbapenemaz pozitif 95 adet izolat için dBLIM'in aerobik şişelerde tespit etmedeki duyarlılığı serin karbapenemazlar ve MBL'ler için %100 olarak, anaerobik şişelerde ise serin

karbapenemazlar için %100, VIM için %56,1, NDM için %80 olarak bulunmuştur. deBLIM serin karbapenemazların kendi içindeki (Ambler sınıf A ve D) ayrımını yapamamaktadır. Ayrıca araştırmacılar birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran izolatlarda deBLIM'in kullanılabilirliğini değerlendirememişlerdir ve çalışmalarının sınırlaması olarak bildirmişlerdir (148). Aerobik şişelerde uyguladığımız dBLIMplus'ın 6 saatte tek karbapenemaz sınıfına ait 24 izolatın 22'sinde (%91,6) doğru Ambler sınıfında belirlediği tespit edilmiş ve dBLIMplus'ın karbapenemaz karakterizasyon duyarlılığı %92,8 olarak; A sınıfı karbapenemazları tespit etmedeki duyarlılığı %87,5, D sınıfı sınıfı karbapenemazları tespit etmedeki duyarlılığı %93,7 olarak belirlenmiştir. Çalışmamızda tek karbapenemaz sınıfı barındıran izolat sayısı nispeten diğer karbapenemaz karakterizasyonu yapılan çalışmalara göre (CIMplus, mCIMplus, deBLIM) az olduğu için duyarlılığın düşük kaldığı, ancak önceki çalışmalardan farklı olarak birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran izolat sayısının çalışmamızda yüksek olduğu görülmektedir. deBLIM'dan farklı olarak bu çalışmada değerlendirdiğimiz dBLIMplus ile serin karbapenemazların kendi içerisinde ayrımının yapılabilmesi dBLIMplus'ın daha geniş yorum yapma potansiyeli sağladığını göstermektedir.

Bianco ve ark., A ve B sınıfı karbapenemazları tanımlamak için sırasıyla PBA ve EDTA gibi spesifik beta-laktamaz inhibitörleri ile bir antibiyotik (MEM veya CTX) kombinasyonunun eklenmesini veya AmpC beta-laktamazları GSBL'lerden ayırt etmek için kloksasilin ve klavulanik asit ile dBLIM'in modifiye edilmesini ileri araştırmalar yapılması açısından önermişlerdir (19). Bu doğrultuda çalışmamızda tanımladığımız dBLIMplus'ın Ambler Sınıf A, B ve D karbapenemazları 6 saatte %92,8 duyarlılık ve %100 özgüllükle tespit edebildiği belirlenmiştir. Altıncı saatte zon çapı değerlendirilmesi görsel olarak 12. ve 18. saate göre daha zor olsa da 12. ve 18. saate göre karbapenemaz karakterizasyonunu daha yüksek duyarlılıkla belirliyor olması nedeniyle dBLIMplus'ın 6. saatte değerlendirilmesinin daha uygun olduğu ve referans yöntemle %90'ın üzerindeki uyumu ile rutin laboratuvar uygulamalarında karbapenemaz aktivitesinin ve karakterizasyonunun tespiti için kullanılabileceği kanaatine varılmıştır.

Çalışmamızda 48. saatte KDT ile karbapenemaz aktivitesi %94,6 duyarlılıkla, karbapenemaz karakterizasyonu %91,7 duyarlılıkla; 6. saatte dBLIMplus ile

karbapenemaz aktivitesi %100 duyarlılıkla, karbapenemaz karakterizasyonu %92,8 duyarlılıkta tespit edildiği bulunmuştur. Kombinasyon disk testi ve dBLIMplus'ın duyarlılık ve özgüllükleri A sınıfı karbapenemazlar için sırasıyla %50-%87,5 ve %100-%100; D sınıfı karbapenemazlar için %93,7-%93,7 ve %98,7-%98,8 olarak belirlenmiştir. D sınıfı karbapenemaz tespitinde duyarlılık ve özgüllükleri benzer iken, A sınıfı karbapenemaz tespitinde dBLIMplus'ın daha yüksek duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür.

Birçok çalışmada belirtildiği gibi karbapenemaz karakterizasyonu için yapılan birçok fenotipik testte birden fazla sınıf karbapenemaz barındıran izolatların karbapenemaz sınıfları fenotipik olarak belirlenememektedir. Çalışmamızda, bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından en az biri dBLIMplus ile tespit edilebildiğinde PZR ile uyumlu olarak değerlendirildiğinde dBLIMplus'ın PZR ile yüksek düzeyde uyumlu olduğu, bir izolatın PZR ile belirlenmiş olan karbapenemaz sınıflarından tamamı dBLIMplus ile tespit edilebildiğinde PZR ile uyumlu olarak değerlendirildiğinde dBLIMplus'ın PZR ile düşük düzeyde uyumlu olduğu gözlenmiştir. Ayrıca çalışmamızda, birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran 32 izolatın dBLIMplus ile %93,7'sinde en az bir karbapenemaz sınıfı doğru olarak belirlenebilmiş olsa da birden fazla karbapenemaz sınıfı üreten izolatlar dBLIMplus için de bir sınırlamadır (Tablo 4.9). Çalışmamızda birden fazla direnç geni içeren suşların tamamında tespit edilen çoklu direnç genlerinden biri OXA-48 idi. Ülkemizde karbapenem direnç mekanizmaları arasında en sık gözlemlendiği bildirilen OXA-48 pozitifliğinin diğer direnç mekanizmalarıyla bir arada görülüyor olması karbapenemaz karakterizasyonunda güçlükler yol açacak gibi görünmektedir. Nitekim, suş sadece OXA-48 pozitif ise TEM diski OXA-48 olduğunu gösterebiliyor iken OXA-48 yanında başka bir direnç geni bulunduğunda, örneğin NDM, OXA-48'in fenotipik olarak tespit edilemediği görülmüştür. Bu durum, suş OXA-48'i fenotipine çok yansıtmamışsa NDM inhibitörü etkisini gösterebiliyor, OXA-48 fenotipine yansiyorsa NDM inhibitörü etkili olmayabilir olarak yorumlanabilir.

Ayrıca, karbapenemaz karakterizasyonunda kullanılan farklı ticari disk setleri ile ya da manuel hazırlanan kombinasyon diskleri ile farklı zon çapı kriterleri elde edilebilir. Bundan dolayı dBLIMplus uygulanırken farklı bir disk seti kullanmadan

önce validasyon yapıp değerlendirme kriterleri kullanılan disk setine göre belirlenmelidir. Diğer taraftan, dBLIMplus'ın non-fermentatif Gram negatif bakteri türleri tarafından üretilenler de dahil olmak üzere çalışmamızdaki izolatların sahip olduğu karbapenemaz türleri dışındaki karbapenemazları da tespit etme yeteneğini değerlendirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

Ayrıca dBLIMplus'ta 'belirsiz sonuç' alınan izolatların da BD MAXTM Check-Points CPO testi ile belirlenemeyen başka bir karbapenemaz türü veya başka bir mekanizma ile dirence sahip olabilecekleri de göz ardı edilmemelidir. Önceki çalışmalarda da belirtildiği gibi yalnızca fenotipik test kullanılarak direnç geni tespit edilememekte, genotipik testlere de ihtiyaç duyulmaktadır. Bu belirsiz sonuçlarımız moleküler yöntemle ve KDT disk seti ile tespit edilemeyen tek başına veya bir arada bulunan başka direnç mekanizmaları ile ilişkili olabilir.

dBLIMplus sonuçlarının okunması ve yorumlanmasının inkübasyondan sonraki 6. saatte mümkün olduğu göz önüne alındığında, laboratuvarlarda iş gününün farklı saatlerinde kan kültürü şişelerinde uygulanabilir olduğu söylenebilir. Beş günlük inkübasyondan sonra negatif sonuç veren kan kültürü şişeleri ile dBLIMplus uygulanmış olması, farklı hastalar arasında kan bileşiminin değişkenliği, ilaç ve/veya antibiyotiklerin varlığı gibi diğer bazı faktörler de dahil olmak üzere günlük klinik rutinde meydana gelebilecek koşulların yansıtılmasını sağlamıştır.

Sonuç olarak, bulgularımız dBLIMplus'ın doğrudan pozitif kan kültürü şişesinden karbapenemaz aktivitesinin tespiti ve karakterizasyonu için oldukça uygun bir fenotipik yöntem olduğunu göstermektedir. Özel ekipman ve reaktifler gerektirmediğinden düşük maliyetlidir. Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarlarının çoğu tarafından pozitif kan kültürü şişelerinde günlük rutinin bir parçası olarak karbapenemaz aktivitesinin ve karakterizasyonunun hızlı belirlenmesi için diğer yöntemlerle birlikte kolayca kullanılabilir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- dBLIMplus, doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden 6 saat gibi kısa bir sürede KPE suşlarını tespit etmede ve karbapenemaz karakterizasyonunda kullanılabilir.
- Karbapenemaz aktivitesinin dBLIMplus ile hızlı tespit edilip bildirilmesi klinisyene antimikrobiyal yönetim ve enfeksiyon kontrol uygulamaları açısından hız kazandırabilir.
- dBLIMplus ile hızlı tespit uygunsuz antimikrobiyal kullanımını da sınırlayacağı için antimikrobiyal direncin azalmasına da katkı sağlayabilir.
- Karbapenemaz karakterizasyonunu standardize edebilmek için daha çeşitli karbapenemaz türlerini içeren daha fazla sayıda iyi tanımlanmış klinik izolat ile çalışmalar yapılması gerekir.
- Standart kombinasyon disk testlerinde birden fazla karbapenemaz sınıfının kategorizasyonunun yapılamıyor olması bu testlerin hali hazırda var olan bir sınırlamasıdır. dBLIMplus ile de birden fazla karbapenemaz sınıfı barındıran izolatların karbapenemaz sınıflarının tamamı tespit edilememiştir. Fenotipik testlerle birden fazla karbapenemaz sınıfını barındıran izolatların tüm karbapenemaz sınıflarının tespitine yönelik ileri araştırmalar yapılmalıdır.
- *Pseudomonas* spp. ve *Acinetobacter* spp. gibi non-fermenter bakterilerde de karbapenemaz aktivitesinin ve karakterizasyonunun tespitine yönelik benzer çalışmalar yapılabilir.

ÖZET

Pozitif Kan Kültürü Şişelerinden Karbapenemaz Üreten *Enterobacterales* Suşlarının Hızlı Tespiti ve Karbapenemaz Karakterizasyonu Amacıyla Kombinasyon Disk Testlerinin Doğrudan Beta-Laktam İnaktivasyon Metoduna Dayalı Olarak Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması

Toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonların başlıca etkenlerinden olan *Enterobacterales*'in neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son tercih olan karbapenemlere karşı antimikrobiyal direnç giderek artmakta ve karbapenem direnci sıklıkla karbapenemaz enzimi üretimi ile olmaktadır. Karbapenemaz enzimlerinin erken tespit edilmesi hem tedavinin doğru planlanabilmesi hem de enfeksiyon kontrolünde oldukça önemlidir. Çalışmamızda, doğrudan beta-laktam inaktivasyon metodunun kombinasyon disk testine dayalı fenotipik yöntemlerle birlikte kullanımının (dBLIMplus) karbapenemaz üreten *Enterobacterales* suşlarının pozitif kan kültürü şişelerinden hızlı tespitinde ve karbapenemaz karakterizasyonunda etkinliği değerlendirilmiştir.

Hastane kaynaklı enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilip *Escherichia coli* veya *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanan 60 adet suş (PZR ile belirlenmiş 15'er adet A, B, D sınıfı karbapenemaz pozitif ve 15 adet karbapenemaz negatif) dBLIMplus validasyonu için seçilmiştir. Validasyon suşlarına dBLIMplus uygulanarak dBLIMplus değerlendirme zon çapı kriterleri belirlenmiştir. Daha sonra dBLIMplus'ın rutin laboratuvarında kullanımını değerlendirmek için *E. coli* veya *K. pneumoniae* olarak tanımlanan toplamda 100 adet klinik suşa dBLIMplus uygulanıp, değerlendirilmiştir. dBLIMplus'ın 6. saatte değerlendirilmesinin daha uygun olduğu, karbapenemaz aktivitesini %100 duyarlılık ve özgüllükle, karbapenemaz karakterizasyonunu ise %92,8 duyarlılık ve %100 özgüllükle tespit ettiği bulunmuştur (Mc Nemar, $p=0,125$; Cohen Kappa $\kappa=0,920$). Tek bir karbapenemaz sınıfına ait direnç geni tespit edilen 24 klinik suşun 22'sinde (%91,6) dBLIMplus ile doğru Ambler sınıfı belirlenebilmiş, A sınıfı karbapenemazları tespit etmede duyarlılığı %87,5, özgüllüğü %100; D sınıfı karbapenemazları tespit etmede duyarlılığı %93,7, özgüllüğü %98,8 olarak bulunmuştur.

Sonuç olarak, dBLIMplus doğrudan pozitif kan kültürü şişelerinden karbapenemaz aktivitesinin tespiti ve karakterizasyonunda referans yöntemle %90'ın üzerindeki uyumu ile rutin laboratuvar uygulamalarında kullanılabilecek oldukça uygun bir fenotipik yöntem olarak ileri sürülebilir. dBLIMplus ile hızlı karbapenemaz tespiti antimikrobiyal yönetim ve enfeksiyon kontrol uygulamaları açısından hız kazandıracığı gibi, uygunsuz antimikrobiyal kullanımını sınırlayarak antimikrobiyal direncin azalmasına da katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal yönetim, dBLIMplus, *Enterobacterales*, Hızlı tespit, Karbapenemaz

ABSTRACT

Investigation of the Effectiveness of Using Combination Disc Tests Based on the Direct Beta-Lactam Inactivation Method for the Rapid Detection and Characterization of Carbapenemase Producing *Enterobacterales* Strains from Positive Blood Culture Bottles

Antimicrobial resistance is gradually increasing against carbapenems, which are the last choice in the treatment of infections caused by *Enterobacterales*, one of the main causes of community and hospital-acquired infections and carbapenem resistance is mainly caused by the production of carbapenemase enzymes. Early detection of carbapenemase enzymes is crucial for the appropriate management of treatment and infection control. In this study, the effectiveness of the direct beta-lactam inactivation method combined with combination disk test-based phenotypic methods (dBLIMplus) was evaluated in the rapid detection and carbapenemase characterization of carbapenemase-producing *Enterobacterales* strains from positive blood culture bottles.

Sixty strains (15 each of class A, B, D carbapenemase positive and 15 carbapenemase negative by PCR), which were evaluated as the causative agent of hospital-acquired infection and identified as *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae*, were selected for dBLIMplus validation. dBLIMplus evaluation zone diameter criteria were determined by applying dBLIMplus to the validation strains. To evaluate the utility of dBLIMplus in the routine laboratory, dBLIMplus was applied to a total of 100 clinical strains identified as *E. coli* or *K. pneumoniae*.

It was determined that it was more appropriate to evaluate dBLIMplus at the 6th hour and that dBLIMplus detected carbapenemase activity with 100% sensitivity and specificity, while carbapenemase characterization could be performed with 92.8% sensitivity and 100% specificity (Mc Nemar, $p=0,125$; Cohen Kappa $\kappa=0,920$). The correct Ambler class could be determined with dBLIMplus in 22/24 clinical strains (91.6%) in which a resistance gene belonging to a single carbapenemase class was detected. While the sensitivity of dBLIMplus in detecting class A carbapenemases was 87.5% and its specificity was 100%, its sensitivity in detecting class D carbapenemases was found to be 93.7% and its specificity was 98.8%.

In conclusion, dBLIMplus can be suggested as a highly appropriate phenotypic method that can be used in routine laboratory applications, with over 90% compatibility with the reference method in the detection and characterization of carbapenemase activity directly from positive blood culture bottles. Rapid carbapenemase detection will accelerate antimicrobial management and infection control practices, as well as contribute to the reduction of antimicrobial resistance by limiting inappropriate antimicrobial use.

Keywords: Antimicrobial management, dBLIMplus, *Enterobacterales*, Rapid detection, Carbapenemase

KAYNAKLAR

1. Tacconelli E, Magrini N, Carrara E, Savoldi A, Kattula D, Burkert F. WHO Global Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria to Guide Research, Discovery, and Development of New Antibiotics. 2017.
2. World Health Organization. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) manual for antimicrobial resistance surveillance in common bacteria causing human infection. Aug 2023. Available: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240076600>
3. Tsai YM, Wang S, Chiu HC, Kao CY, Wen LL. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. BMC Microbiol. 2020; 20(1).
4. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, etc. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect Dis. 2016;16(2):161-8.
5. Patel G, Bonomo RA. “Stormy waters ahead”: Global emergence of carbapenemases. Frontiers in Microbiology. 2013; 4:117.
6. WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. Geneva: World Health Organization; 2024. Access address: <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health> (accessed on May 2024)
7. Petit M, Cam  lena F, Cointe A, Poncin T, Merim  che M, Birgy A, et al. Rapid detection and characterization of carbapenemases in *Enterobacterales* with a new modified carbapenem inactivation method, mCIMplus. J Clin Microbiol. 2020; 58(11):01370-20.
8. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. Clinical Microbiology Reviews. 2005; 18:657-86.
9. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 2007; 20:440-58.
10. Martinez-Martinez L, Cant  n Spain R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, etc. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
11. Hrab  k J, Chud  ckov   E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: A challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clinical Microbiology and Infection. 2014; 20:839-53.
12. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. PLoS One. 2015;10(3).
13. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 25th ed; 2015. CLSI supplement M100-S25.
14. Butler-Wu SM, Abbott AN. Is this the carbapenemase test we’ve been waiting for? A multicenter evaluation of the modified carbapenem inactivation method. Journal of Clinical Microbiology. 2017; 55:2309-12.
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 27th ed; 2017. CLSI supplement M100-S27.
16. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Evaluation of the modified carbapenem inactivation method and sodium mercaptoacetate-combination method for the detection of metallo- β -lactamase production by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods. 2017; 132:112-5.

17. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, etc. EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* J. Clin. Microbiol. 2019; 57:01757-18.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 28th ed; 2018. CLSI supplement M100-S28.
19. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Fossati L, Cavallo R, Costa C. Direct β -lactam inactivation method: A new low-cost assay for rapid detection of carbapenemase- Or extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacterales* directly from positive blood culture bottles. J Clin Microbiol. 2020;58(1).
20. Procop Gary W., Church Deirdre L., Hall Geraldine S., Janda William M., Koneman Elmer W., Schreckenberger Paul C. WGL. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology Türkçe baskı. 7. baskı. Prof. Dr.Ahmet Başustaoglu PDADU, editor. Hipokrat yayınevi; 2017; 213–273:1075–1160.
21. Dos Santos GS, et al. "Study of the *Enterobacteriaceae* Group CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella* and *Hafnia*): A Review."The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs (A. Méndez-Vilas, Ed.) FORMATEX. 2015; 794-805.
22. Ashurst J V, Dawson A. *Klebsiella pneumoniae*. 2018 Stat Pearls Publishing; Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519004/> (accessed on May 2024).
23. Schaberg DR, Arbor A, Culver DH, Gaynes RP. Major Trends in the Microbial Etiology of Nosocomial Infection. Am. J. Med. 1991; 91:72–75.
24. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 2016;80(3):629-61.
25. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp.as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 1:589-603.
26. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016;4(1).
27. Yu WL, Chuang YC. Clinical features, diagnosis, and treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection 2015:1-38.
28. Paterson DL, Siu K, Chang FY. *Klebsiella species* (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. ozaenae* and *K. rhinoscleromatis*). Infectious disease and antimicrobial agents. 2014; 9:74–6.
29. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella species* delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov, *Raoultella terrigena* comb. nov., and *Raoultella planticola* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol 2001; 51:925–932.
30. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020; 17:1-17.
31. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: Mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. Trends in Microbiology. 2014; 22:438-45.
32. Philippon A, Labia R, Jacoby G. Extended-Spectrum β -Lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1989; 33:1131–1136.
33. Sirot D, Sirot J, Labia R, Morand A, Courvalin P, Darfeuille-Michaud A, etc. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 1987; 20:323–334.
34. Jacoby GA, Sutton L. Properties of Plasmids Responsible for Production of Extended-Spectrum β -lactamases. Antimicrob. Agents Chemother. 1991; 35:164-169.

35. Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of Inoculum and β -Lactamase Activity in AmpC- and Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Tested by Using NCCLS ESBL Methodology. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(1):269-75.
36. Bauernfeind A, Chong Y, Schweighart S. Extended broad-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection.* 1989; 17:316–321.
37. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin. Infect. Dis.* 2005; 40:1333–1341.
38. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, etc. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: First report of a multiclonal cluster. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2007;59(4):786-90.
39. Luo Q, Wang Y, Xiao Y. Prevalence and transmission of mobilized colistin resistance (mcr) gene in bacteria common to animals and humans. *Biosafety and Health.* 2020; 2(2): 71-78.
40. Castanheira M, Farrell SE, Krause KM, Jones RN, Sader HS. Contemporary diversity of β -lactamases among *Enterobacteriaceae* in the nine U.S. census regions and ceftazidime-avibactam activity tested against isolates producing the most prevalent β -lactamase groups. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(2):833-8.
41. Aktaş Z, Kayacan C, Oncul O. In vitro activity of avibactam (NXL104) in combination with β -lactams against Gram-negative bacteria, including OXA-48 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2012;39(1):86-9.
42. Humphries RM, Yang S, Hemarajata P, Ward KW, Hindler JA, Miller SA, etc. First report of ceftazidime-avibactam resistance in a KPC-3-expressing *Klebsiella pneumoniae* isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6605-7.
43. Xu T, Guo Y, Ji Y, Wang B, Zhou K. Epidemiology and Mechanisms of Ceftazidime-avibactam Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Engineering.* 2022; 11:138-45.
44. Lim JY, Yoon JW, Hovde CJ. A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. 2010;20:5.
45. Kauffmann F. The serology of the *E. coli* group. *The Journal of Immunology.* 1947; 571:71-100.
46. Makvana S, Krilov LR. *Escherichia coli* Infections. *Pediatr Rev.* 2015; 36:167–70.
47. Brooks GF et al. Jawetz, Melnick, Adelberg Tibbi Mikrobiyoloji; Yenen OŞ (Çeviri Ed), Nobel Tıp Kitapları. 2014;167.
48. Allocati N, Masulli M, Alexeyev MF, Di Ilio C. *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health.* 2013; 10:6235-54.
49. Griffin PM, Tauxe R V. The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7, Other Enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated Hemolytic Uremic Syndrome. 1991; 13:60-98.
50. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11:142–201.
51. Bien J, Sokolova O, Bozko P. Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *Int J Nephrol.* 2012; 3:681473–15.
52. Bardiau M, Szalo M, Mainil JG. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet. Res.* 2010; 41:57–72.
53. Zhao W, Yang S, Huang Q, Cai P. Bacterial cell surface properties: Role of loosely bound extracellular polymeric substances (LB-EPS). *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015; 128:600-7.
54. Reygaert WC. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol.* 2018;4(3):482-501.

55. Pitout JDD, Nordmann P, Laupland KB, Poirel L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Temmuz 2005;56(1):52-9.
56. Galindo-Méndez M. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *E. coli Infections-Importance of Early Diagnosis and Efficient Treatment*. 2020:1–20.
57. Jacoby GA. AmpC B-Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009; 22:161-82.
58. Poole K. Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2004; 61:2200-23.
59. Fisher JF, Meroueh SO, Mobashery S. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: Compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*. 2005; 105:395-424.
60. Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*. 1997; 24:19–S45.
61. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005; 8:525-33.
62. Piddock LJV. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19:382-402.
63. Weldhagen GF. Integrons and β -lactamases-a novel perspective on resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2004; 23:556-62.
64. Richmond MH, Sykes RB. The β -Lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol*. 1973; 9:31–88.
65. Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B, Biol Sci*. 1980; 289:321-31.
66. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AAA. functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39:1211–33.
67. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010; 50:969-76.
68. Mammeri H, Nordmann P, Berkani A, Eb F. Contribution of extended-spectrum AmpC (ESAC) β -lactamases to carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. May 2008;282(2):238-40.
69. Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Cile Meunier C, E. de Pauw G, etc. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1999; 43:902-906.
70. Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Foster C, Reig R. Plasmid-determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1983; 12:507-510.
71. Matthew M. Plasmid mediated β -lactamases of gram-negative bacteria: properties and distribution. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1979; 5:349-358.
72. Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004; 48:1-14.
73. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Cefotaximases (CTX-M-ases), an expanding family of extended-spectrum β -lactamases. *Canadian Journal of Microbiology*. 2004; 50:137-65.
74. Sirot D, Recule C, Chaibi EB, Bret L, Croize J, Chanal-Claris C, etc. A complex mutant of TEM-1 β -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1997; 41:1322-1325.
75. Rasmussen B.A., Bush K. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamases. *Anti microb. Agents Chemother*. 1997; 41:223-232.

76. Bradford PA. Extended-spectrum b-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001; 14:933–51.
77. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-b-lactamase. Clin Infect Dis 2000; 31:1119–1125.
78. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. In: Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers, 2015; 36:074-084.
79. Ambler, R, et al. A standard numbering scheme for the class A beta lactamases Biochemical Journal, 1991; 276:269-270.
80. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak The Journal of hospital infection 2010; 74(4):344-9.
81. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*-second update Event background Current situation of CRE in EU/EEA countries. 2019. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-rev-2.pdf>.
82. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A b-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 7693–7697.
83. Duin D van, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Virulence. 2017; 8(4):460–9.
84. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. New Microbes New Infect. 2014; 2(2): 50-1.
85. Yong D. et al. Characterization of a new metallo-β-lactamase Gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53:5046–5054.
86. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Özer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(5):2784-5.
87. 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.
88. Wise, M, et al. Global Trends in Carbapenem-and Difficult-to-Treat-Resistance Among World Health Organization Priority Bacterial Pathogens: ATLAS Surveillance Program 2018-2022. Journal of Global Antimicrobial Resistance. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.03.020>
89. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, etc. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. Lancet Infect Dis. 2017; 17(2):153-63.
90. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) capacity survey group. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. assessment by national experts from 37 countries. July 2018. Euro Surveill 2019; 24(9): 1-8.
91. European Centre for Disease Prevention and Control, World Health Organization: Antimicrobial resistance surveillance in Europe: 2023: 2021 data. Access address: <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289058537> (accessed on May 2024)

92. WHO Regional Office for Europe and European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe, 2022 data: executive summary. Europe; 2023. Access address: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2022-data> (May 2024)
93. European Centre for Disease Prevention and Control Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net), 2022. Access address: <https://atlas.ecdc.europa.eu/> (accessed on May 2024)
94. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Çöplü N, Gülay Z. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) Dış Kalite Değerlendirme Çalışmaları. Mikrobiyol Bul, 2017; 51.3:247-259.
95. Carbapenem-resistant *Enterobacterales* (CRE) Centers for Disease Control and Prevention, 2019. Access address: https://www.cdc.gov/cre/about/?CDC_AAref_Val (accessed on May 2024)
96. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Clin Microbiol Infect 2012;18:432-8.
97. Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, etc. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: Multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol. 2003; 41(1):351-8.
98. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. International Journal of Antimicrobial Agents. 2010; 36:205-10.
99. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, etc. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. Clinical Infectious Diseases. Oxford University Press; 2018; 66:1290-7.
100. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. J Clin Microbiol. 2015; 53(12):3908-11.
101. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in gram-negative bacilli J Clin Microbiol 2015; 53(6):1996-8.
102. Compain F, Gallah S, Eckert C, Arlet G, Ramahefasolo A, et al. Assessment of Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae* with the Rapid and Easy-to-Use Chromogenic β -Carba Test J Clin Microbiol 2016; 54(12):3065-3068.
103. Liu Y, Luan L, Wan N, Liu J. Rapid Carbapenem Inactivation Method (rCIM): A New Phenotypic Method for Rapidly Detecting Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Rapid carbapenem inactivation method (rCIM): A new 1 phenotypic method for rapidly detecting 2 carbapenemase-producing *Enterobacterales*. 2020. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-58147/v1>
104. Pierce VM, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2017; 55:2321–2333.
105. Papagiannitsis CC, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity J Clin Microbiol 2015; 53(5):1731.
106. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, 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; 71(5):1217-22.
107. Perry JD. A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. Clinical microbiology reviews, 2017; 30(2):449-479.
108. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2013; 68:487-489.

109. Simon M, Gatermann S, Pfeifer Y, Reischl U, Gessner A, Jantsch J. Evaluation of the automated BD Phoenix CPO Detect panel in combination with the β -CARBA assay for detection and classification of carbapenemase-producing *Enterobacterales*. *Journal of microbiological methods*. 2019; 156:29-33
110. Dortet L, Br  chard L, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P Strategy for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(4):2441-5.
111. Milillo M, Kwak YI, Snesrud E, Waterman PE, Lesho E, McGann P Rapid and simultaneous detection of blaKPC and blaNDM by use of multiplex real-time PCR *J Clin Microbiol* 2013; 51(4):1247-9.
112. Cuzon G. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases, plasmid-mediated cephalosporinases and carbapenemases *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(8):1865-9.
113. Fishbain JT, Sinyavskiy O, Riederer K, Hujer AM, Bonomo RA. Detection of extended-spectrum beta-lactamase and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes directly from blood cultures by use of a nucleic acid microarray *J Clin Microbiol* 2012; 50(9):2901-4.
114. Kitchel B, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258 *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8):3365-70.
115. Snitkin ES, Zelazny AM, Thomas PJ, et al; NISC Comparative Sequencing Program Group Tracking a hospital outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing *Sci Transl Med* 2012; 4:148ra116.
116. Mathers AJ, Stoesser N, Sheppard AE, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K pneumoniae* at a single institution: insights into endemicity from whole-genome sequencing *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59:1656-63.
117. Pecora ND, Li N, Allard M, et al. Genomically informed surveillance for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system *MBio* 2015 ;6: e01030.
118. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2023. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 33th ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
119. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, second update 26 September 2019. ECDC: Stockholm; 2019. Access address: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/carbapenem-resistant-enterobacteriaceae-risk-assessment-rev-2.pdf>.
120. Alp E, Per  in D, Colako  lu S, Durmaz S, K  rkc   CA, Ekinci  lu P, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect*. 2013; 84:178-180.
121. Iraz M, D  zg  n A  , Sandalli C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A, etc. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med*. 2015; 35(6):595-601.
122. Ciftci E, Cetin ES, Us E, Kutlu HH, Aridogan BC. Investigation of Carbapenem resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* by using phenotypic tests and a molecular assay. *J Infect Dev Ctries*. 2019; 13(11):992-1000.
123. Demiray T, Aydemir   , Kılı     , Yılmaz K, K  ro  lu M, Altındı   M. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz saptanmasında karbapenemaz inaktivasyon testinin kullanımı. *T  rk Mikrobiyoloji Cemiy Derg*. 2017; 47(2):78-82.
124. Tekintaş Y,   illi F, Era   B, Yaşar M, Aydemir S  , Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2017; 51(3):269-76. <https://doi.org/10.5578/mb.57333>.

125. Genç S, Kolaylı F, Özçelik EY. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first *K. pneumoniae* isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. J Infect Chemother. 2022; 28(2):192-198. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.10.009>.
126. Köle M, Sesli Çetin E, Şirin MC, CiciOğlu Aridoğan B. Evaluation of In Vitro Efficacy of Ceftazidime-Avibactam, Meropenem, and Colistin Single and Binary Combinations Against Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Various Clinical Specimens. Mikrobiyol Bul. 2022; 56(2):230-50.
127. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kiliç S, etc. The epidemiology of carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2019 in Turkey. Mikrobiyol Bul. 2021; 55(1):1-16.
128. Telli M. *Klebsiella pneumoniae* klinik suşlarında, 2012-2020 yılları arasında karbapenem direnç oranlarındaki değişimin ve direnç genlerinin araştırılması. Turk Mikrobiyol Cemiy Derg. 2022; 52(2):95-102. doi:10.54453/TMCD.2022.05025.
129. Çalık Ş, Kansak N, Aksaray S. Phenotypic detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant isolates with the rapid carbapenemase detection method (rCDM). J Microbiol Methods. 2022; 200: 106536.
130. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Özhak BB, et al. Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey. Mikrobiyol Bul 2016; 50(1): 21-33. <https://doi.org/10.5578/mb.10695>
131. Zhang Z, Wang D, Li Y, Liu Y and Qin X. Comparison of the Performance of Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in Clinical Practice. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2022; 12:849564. doi: 10.3389/fcimb.2022.849564.
132. Hu W, Li M, Lu W, Guo S, Li J. Evaluation of MASTDISCS combi Carba plus for the identification of metallo- β -lactamases, KPC and OXA-48 carbapenemase genes in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. Lett Appl Microbiol. 01 January 2020; 70(1):42-7.
133. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Systematic Comparison of Three Commercially Available Combination Disc Tests and the Zinc-Supplemented Carbapenem Inactivation Method (zCIM) for Carbapenemase Detection in *Enterobacterales* Isolates. J Clin Microbiol. 2021; 59(9): e 0314020.
134. Taha R, Kader O, Shawky S, Rezk S. Ceftazidime-Avibactam plus aztreonam synergistic combination tested against carbapenem-resistant *Enterobacterales* characterized phenotypically and genotypically: a glimmer of hope. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 01 December 2023; 22(1).
135. Li J, Li C, Cai X, Shi J, Feng L, Tang K, etc. Performance of modified carbapenem inactivation method and inhibitor-based combined disk test in the detection and distinguishing of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. Ann Transl Med. 2019; 7(20):566-566.
136. Ohsaki Y, Kubo R, Hobson J, Davies M, Osaka S, Hayashi W, Taniguchi Y, Koide S, Nagano Y, Nagano N. MASTDISCS combi Carba plus, a simple method for discriminating carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, including OXA-48-type producers. Microbiol Immunol. 2018; 62:60–65.
137. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. August 2012; 18(9):1503-7.
138. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: Comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press; 2016; 71:274-6.
139. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Microbiol Methods. 2016; 128:48-51.

140. Bianco G, Boattini M, van Asten SAV, Iannaccone M, Zanotto E, Zaccaria T, etc. RESIST-5 O.O.K.N.V. and NG-Test Carba 5 assays for the rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacterales* from positive blood cultures: a comparative study. *Journal of Hospital Infection*. 01 June 2020; 105(2):162-6.
141. Choquet M, Guiheneuf R, Castelain S, Cattoir V, Auzou M, Pluquet E, etc. Comparison of MALDI-ToF MS with the Rapidec Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 01 January 2018; 37(1):149-55.
142. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, etc. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Front Microbiol*. 2018; 9:2391.
143. Jing X, Min X, Zhang X, Gong L, Wu T, Sun R, etc. The Rapid Carbapenemase Detection Method (rCDM) for Rapid and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019; 9:371.
144. Meier, M.; Hamprecht, A. Systematic Comparison of Four Methods for Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* Directly from Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol*. 2019; 57: e00709-19.
145. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2018. EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, v 1.0. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf.
146. EUCAST Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistance of clinical and/or epidemiological importance using EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles, v 2.0, April 2022. Available: https://www.eucast.org/screening_for_resistance_mechanisms_with_rast
147. Caméléna F, Cointe A, Mathy V, Hobson C, Doit C, Bercot B, etc. Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by use of a new carbapenem inactivation method-based test, CIMplus. *J Clin Microbiol*. 01 September 2018; 56(9).
148. Bianco G, Boattini M, Iannaccone M, Zanotto E, Cavallo R, Costa C. Direct Ethylenediaminetetraacetic acid-Modified β -Lactam Inactivation Method: An Improved Method to Identify Serine-Carbapenemase-, Metallo- β -Lactamase-, and Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Enterobacterales* Directly from Positive Blood Culture. *Microbial Drug Resistance*. 01 June 2021; 27(6):740-6.