

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM  
DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE *ESCHERICHIA  
COLI* SUŞLARINDA KARBAPENEMAZ VARLIĞININ  
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Asiye BIÇAKÇIGİL**

UZMANLIK TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır

ANKARA

2018

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRÜNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM  
DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE *ESCHERICHIA  
COLI* SUŞLARINDA KARBAPENEMAZ VARLIĞININ  
FENOTİPİK VE MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE  
ARAŞTIRILMASI**

**Dr. Asiye BIÇAKÇIGİL**

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

**Prof. Dr. Banu SANCAK**

ANKARA

2018

## TEŞEKKÜR

Öncelikle, eğitimim boyunca yanında çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübelerinden her zaman yararlandığım, her durumda ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, dürüstlüğü, yardımseverliği ve çalışma azmini örnek aldığım, üzerimde çok büyük emeği olan ve tezimin gerçekleşmesinde de çok büyük katkısı bulunan, benim için bir danışman hocadan çok öte olan, büyük saygı ve sevgi duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Banu SANCAK'a çok teşekkür ederim. Ayrıca desteğini hiç bir zaman benden esirgemeyen, iyi ve kötü günlerimde varlığını daima hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Cumhur ÖZKUYUMCU başta olmak üzere uzmanlık eğitimime katkısı olan diğer tüm hocalarıma da teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca uzmanlık eğitimim boyunca maddi ve manevi desteğini hiç esirgemeyen, en zor zamanlarımda hep yanımda olan, kocaman gözleriyle bana hep umut veren, güzel kalpli arkadaşım Ümran LİSTE'ye de teşekkür ederim.

Tezimin yapım aşamasında bana büyük yardımları olan, başta Doç. Dr. Belgin ALTUN olmak üzere tüm Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Mikrobiyoloji Ünitesi çalışanlarına teşekkür ederim. Yine tezimin yapım aşamasında destekleri olan Nejla KILIÇ ve İrfan ATMACA'ya da teşekkürü bir borç bilirim.

Benim bugünlere gelmemde en büyük paya sahip olan, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim annem Fatıma SÖYLEMEZ, babam Muharrem SÖYLEMEZ ve hayattaki en büyük destekçilerim olan kardeşlerim Ahmet SÖYLEMEZ, Amine AKÇELİK, Mustafa SÖYLEMEZ ve Gül Hatice SÖYLEMEZ'e sonsuz teşekkür ederim.

İyi ve kötü günlerimde daima yanımda olan, sevinç ve üzüntülerimi paylaştığım, yol arkadaşım, can yoldaşım sevgili eşim Muhammed BIÇAKÇIGİL ve tabiki hayattaki en büyük mutluluk kaynağım olan biricik kızım Rukiye Bilge BIÇAKÇIGİL'e de çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Bıçakçığıl A., Kan kültüründen izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında karbapenemaz varlığının fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık tezi, Ankara, 2018.** Karbapenem grubu antibiyotikler çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında önemli bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedirler. Ancak, günümüzde bu grup ilaçları hidrolize eden enzimlerin ortaya çıkmasıyla karbapenemlere karşı direnç sıkça görülmeye başlanmıştır. Dünya genelinde bu dirençten sorumlu tutulan en önemli karbapenemazlar ve metallo-beta-laktamazlar KPC, OXA-48, NDM, VIM ve IMP enzimleri olarak bildirilmektedir. Dirençle ilgili önemli bir konu da heterojen direnç kavramıdır. Heterojen direnç kavramı tam anlaşılammakla birlikte tedavi başarısı üzerinde önemli etkisi olduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarının karbapenem direnci farklı yöntemlerle araştırılmış, karbapenemaz enzim varlığı fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanmıştır. Ayrıca karbapenemlere karşı heterojen direnç varlığı da araştırılmıştır.

Çalışmamıza Ocak 2016 ve Ağustos 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesine gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen 105 *E.coli* ve 196 *K.pneumoniae* olmak üzere toplam 301 *Enterobacteriaceae* suşu dahil edilmiştir. Karbapenem direncine gradient test, disk difüzyon yöntemi, sensititre mikrodilüsyon, Phoenix otomatize sistemleri ile bakılırken, karbapenemaz varlığı CIM (Karbapenemaz İnaktivasyon Metodu), MHT (Modifiye Hodge Testi) ve Rosco confirmasyon diski kullanılarak değerlendirilmiştir. KPC, VIM, IMP, NDM-1 ve OXA-48 karbapenemazlarını kodlayan gen bölgeleri de polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak araştırılmıştır.

İzolatların 160'ında en az bir yöntem ile karbapenemlere azalmış duyarlılık veya direnç saptanmıştır. Karbapenem orta duyarlı veya dirençli bulunan izolatların 147'sinde (%91,8), karbapenemaz kodlayan genlerden en az birinin varlığı belirlenmiştir. Karbapenemaz enzimlerinden en sık OXA-48 (142/160;%88,7) saptanmış ve bunu sırasıyla NDM-1 (14/160;%8,7), VIM (5/160;%3,1) ve KPC (1/160;%0,6) izlemiştir. İzolatların hiç birinde IMP enzimi gözlenmemiştir.

Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullanılan MHT ve CIM testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla, %93,1-%94,1 ve %69,3-%97,4 bulunmuştur. Karbapenemaz confirmasyon disk sonuçları ile PZR sonuçları karşılaştırıldığında ise uyum %93,2 olarak saptanmıştır.

Çalışmada yer alan 21 izolat (%6,9) karbapenem heterodirençli olarak bulunmuş ve bu izolatların 18'inde (%85,7) OXA-48 enzimi saptanmıştır. Heterojen dirençli bulunan suşların 16'sı *K.pneumoniae* ve 5'i *E.coli* izolatıdır. Bizim çalışmamız OXA-48 pozitif *K.pneumoniae* izolatlarında yapılmış ikinci heterojen direnç çalışmadır. OXA-48 pozitif *E.coli* izolatlarında ise karbapenem heterodirencinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Anahtar Kelimeler: Karbapenemler, karbapenemazlar, heterodirenç

Destekleyen Kuruluş: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje

Birimi

Proje no: TSA-2017-16275

## ABSTRACT

**Bicakcigil A., Investigation of the presence of carbapenemase in *K.pneumoniae* and *E.coli* strains isolated from blood culture by phenotypic and molecular methods. Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis In Medical Microbiology, Ankara, 2018.** Carbapenem group antibiotics admitted as a significant treatment option in multi-drug resistant *Enterobacteriaceae* infections. Unfortunately, resistance to carbapenems has started to be seen frequently with showing up enzymes which hydrolyze this group of drugs. It is reported that carbapenemase enzymes such as KPC, OXA-48, NDM, VIM and IMP are responsible for this resistance mostly in the worldwide. Heteroresistance concept is another important issue about carbapenem resistance. Although, the mechanism of heteroresistance is not fully understood, it is thought to be effective on treatment success. In this study, carbapenem resistance of *K.pneumoniae* ve *E.coli* strains isolated from blood culture were investigated by different methods. The presence of carbapenemases were also determined by using phenotypic and molecular methods. In addition, the presence of carbapenem heteroresistance was investigated.

A total of 301 *Enterobacteriaceae* strains, including 105 *E.coli* and 196 *K.pneumoniae* blood isolates, which sent to the Bacteriology Laboratory of Hacettepe University Hospital between January 2016 and August 2018, were included in the study. Carbapenem resistance was evaluated by using gradient test, disk diffusion test, sensititre microdilution test and Phoenix automated systems. The presence of carbapenemase was investigated by using CIM (Carbapenem Inactivation Method), MHT (Modified Hodge Test) and Rosco confirmation disc. Polymerase chain reaction (PCR) was used for the detection of the KPC, VIM, IMP, NDM-1 and OXA-48 gene regions.

Resistance or decreased susceptibility to carbapenems was detected in 160 blood isolates by at least one method. The presence of at least one carbapenemase gene were detected in 147 (91.8%) of the isolates that were

intermediate or resistant to carbapenem. OXA-48 (142/160; 88.7%) was the most common carbapenemase enzyme, following by NDM-1 (14/160;%8,7), VIM (5/160;%3,1) and KPC (1/160;%0,6). IMP enzyme was not observed in any of the isolates.

The sensitivity and specificity of the MHT and CIM tests were found as 93.1%-94.1% and 69.3%-97.4%, respectively. When the carbapenemase confirmation disc results were compared with PCR results, the compliance was detected as 93,2 %.

In this study carbapenem heteroresistance was detected in 21 (16 *K.pneumoniae* and 5 *E.coli*) isolates (6,9%). In 18 (85,7%) of these isolates OXA-48 enzyme was obtained. Our study is the second study showing carbapenem heteroresistance in OXA-48 positive *K.pneumoniae* isolates. However, this is first study about carbapenem heteroresistance detected in OXA-48 positive *E.coli* isolates.

Keywords: Carbapenems, carbapenemases, heteroresistance

Supported by Hacettepe University Scientific Research Project Unit

Project number: TSA-2017-16275

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Karbapenemler	3
2.1.1. İmipenem	3
2.1.2. Meropenem	4
2.1.3. Ertapenem	4
2.2. Karbapenemlerde Direnç Mekanizmaları	5
2.2.1. İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşmaması	5
2.2.1.1. Porin Değişimleri	5
2.2.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi	6
2.2.2. Hedef PBP Değişimleri	6
2.2.3. Beta-laktamları Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı (Beta-laktamazlar)	6
2.2.3.1. Kromozomal (Doğal) Karbapenemazlar	10
2.2.3.2. Kazanılmış Karbapenemazlar	10
2.3. Türkiye'de Karbapenemaz Epidemiyolojisi	16

2.4. Karbapenemazlarda Heterojen Direnç	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM	21
3.1. İzolatlar	21
3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri	21
3.2.1. Kirby-bauer Disk Difüzyon Yöntemi	21
3.2.2. Gradient Test Yöntemi	22
3.2.3. Sensititre® Mikrodilüsyon Yöntemi	22
3.2.4. Otomatize Sistem	23
3.3. Karbapenemaz Aktivitesinin Belirlenmesi	23
3.3.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM Testi)	23
3.3.2. Modifiye Hodge Testi	24
3.3.3. Karbapenemaz Konfirmasyon Disk Difüzyon Yöntemi	24
3.4. Karbapenemazların Genotipik Yöntemle Araştırılması	25
3.4.1. Bakteriyel DNA'nın Ekstraksiyonu	26
3.4.2. Primerlerin Hazırlanışı	26
3.4.3. PZR İle Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu	27
3.4.4. Agaroz-Jel Elektroforez	28
3.5. Heterojen Direnç Gösteren İzolatların Saptanması	29
3.5.1. 'Popülasyon Analiz Profili' (PAP) Yöntemi	30
4. BULGULAR	32
5. TARTIŞMA	47
KAYNAKLAR	57

## SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHIB	Brain Heart Infusion Broth
CIM	Carbapenem Inactivation Method
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DHP-I	Dehidropeptidaz-I
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
EUCAST	<i>European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz
IMP	İmipenemaz
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Karbapenemaz
MBL	Metallo-Beta-Laktamaz
MHA	Mueller Hinton Agar
MHT	Modifiye Hodge Testi
MİK	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NDM	New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz
OXA	Oksasilinaz
PAP	<i>Population Analysis Profile</i>
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
TAE	Tris-Asetik Asit-EDTA
VIM	Verona İntegron Aracılı Metallo-Beta-Laktamaz

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Bakterilerin antibiyotiklere karşı heterojen ya da homojen şekilde görülen cevabı	19
4.1. Örneklerin kliniklere göre dağılımı	33
4.2. Yoğun bakım ve diğer bölümlere göre çocuk/erişkin hasta dağılımı	33
4.3. PZR yöntemiyle saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı	38
4.4. MHT ile karbapenemaz varlığının gösterilmesi	40
4.5. CIM testi ile karbapenemaz varlığının gösterilmesi	41
4.6. Gradient testte inhibisyon elipsi içinde üreme gösteren <i>K.pneumoniae</i> ve <i>E.coli</i> izolatı	44

## TABLULAR

<b>Tablo</b>	<b>Sayfa</b>
2.1. Beta-laktamazların sınıflandırılması	8
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip beta-laktamaz enzimler	11
3.1. Karbapenemaz konfirmasyon disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler	25
3.2 Karbapenem direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primer dizileri	27
3.3. PZR reaksiyon karışımı	28
3.4. Tüm gen bölgesi için kullanılan PZR protokolü	28
4.1. Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen imipenem duyarlılık sonuçları	34
4.2. Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen ertapenem duyarlılık sonuçları	35
4.3. Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen meropenem duyarlılık sonuçları	35
4.4. Ertapenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	36
4.5. İmipenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	36

4.6. Meropenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	37
4.7. Meropenem duyarlılığının saptanmasında Sensititre mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması	37
4.8. PZR yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması	39
4.9. Karbapenemaz varlığı saptanan <i>K.pneumoniae</i> ve <i>E.coli</i> izolatlarında karbapenemaz tiplerinin dağılımı	40
4.10. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile Modifiye Hodge Testi (MHT) sonuçlarının karşılaştırılması	41
4.11. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile karbapenemaz inaktivasyon metodu (CIM) sonuçlarının karşılaştırılması	42
4.12. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile karbapenemaz konfirmasyon disk sonuçlarının karşılaştırılması	43
4.13. Heterojen dirençli izolatlar ve alt popülasyon sıklığı	45

## 1.GİRİŞ

*Enterobacteriaceae* üyeleri bakteriyemi ve çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaları açısından oldukça önemlidir. Bu bakterilerde beta-laktam grubu ilaçlara karşı görülen en önemli direnç mekanizmalarından birisi geniş spektrumlu beta-laktamaz üretilmesidir. Bu da bu bakterilerle meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin tercih edilmesine yol açmaktadır. Buna bağlı olarak özellikle *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem dirençli izolatların sayısında giderek artış saptanmaktadır (1).

Karbapenemazlar; penisilinleri, genellikle sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Avrupa'da karbapenemaz üreten izolatların artması 1990'lı yıllarda başlamış ve ilk olarak da *Pseudomonas aeruginosa*'da gözlenmiştir. Bunu takiben Yunanistan'da *K.pneumoniae* izolatlarında bir Verona integron aracılı metallo-beta-laktamazı (VIM) salgını ortaya çıkmış, bunu bir *K.pneumoniae* karbapenemazı (KPC) salgını izlemiştir. Günümüzde KPC, Avrupa ülkelerinde *Enterobacteriaceae* üyelerinde en sık saptanan karbapenemazdır. Bunların dışında özellikle Hindistan ve Orta Doğu ülkelerinde prevalansı yüksek olan ve Avrupa ülkelerine yayılan New Delhi metallo-beta-laktamaz (NDM) ile Türkiye'de ve çeşitli Avrupa ülkelerinde yaygın olarak görülen OXA-48 benzeri beta-laktamazlar sıkça karşımıza çıkan karbapenemazlar arasında yer alır (1).

Karbapenemazlar, tüm beta-laktam grubu ilaçlara karşı direnç oluşturdukları için tedavi açısından endişe vericidirler. Karbapenemaz üreten suşlar genellikle diğer direnç mekanizmalarını da taşıdıkları için çoklu ilaç direnci gösterirler. Ayrıca karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleriyle meydana gelen enfeksiyonlarda yüksek mortalite hızları da dikkat çekmektedir (2).

Bu çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarının karbapenem direnç durumu farklı yöntemler kullanılarak araştırılmış, direnç tespit edilen suşlarda ise karbapenemaz varlığı fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılarak saptanmıştır. Bunlara ek olarak karbapenemlere karşı heterojen direnç varlığı araştırılmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Karbapenemler

Karbapenemler günümüzde beta-laktam grubu antibiyotikler içerisinde en geniş spektrumlu, gram pozitif ve negatif bakterilere karşı etkili antibiyotikler olarak kabul edilmektedirler (3,4). Diğer beta-laktam grubu antibiyotiklerde olduğu gibi peptidoglikan tabakası üzerinden etki göstermektedirler.

Karbapenemler ilk kez 1976'da *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve "thienamycin" ismi verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak oluşturulmuştur (3,5). Yapısal olarak diğer beta-laktamlardan farklı olup karbapenemler 6 pozisyonundaki trans konfigürasyonda bir hidroksietil yan zincirine sahiptirler ve bu yapı sayesinde beta-laktamazlara karşı dayanıklılık göstermektedirler (3).

İmipenem ve meropenemin 1980'li yıllardan bu yana ciddi enfeksiyonlarda güvenle kullanımını takiben 2001 yılında ertapenem ve daha sonra doripenemin ve diğer üyelerin gruba dahil olması ile karbapenem grubu genişleme göstermiştir (4).

#### 2.1.1. İmipenem

Karbapenem grubu antibiyotiklerin ilk üyesi olan imipenem bir N-formimidoyl tienamisindir (3,4,6). İmipenem gram pozitif, gram negatif, aerop ve anaerop mikroorganizmaları içine alan çok geniş bir etki spektrumuna sahiptir (7).

İmipenem proksimal renal tübüler hücrelerde bulunan dehidropeptidaz- I (DHP-I) enzimi tarafından böbreklerde metabolize edilerek inaktive edilmektedir (3,4). Metaboliti nefrotoksik olduğu için silastatin ile birlikte kullanılmaktadır (3,4,7). Silastatin sodyum, DHP-I'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür (7).

İmipenem diğer beta-laktam grubu antibiyotikler gibi hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösteren, bakterisidal etkili bir antibiyotiktir. Etkisini gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı penisilin bağlayan protein (PBP)'lerine yüksek afinite ile bağlanarak göstermektedir (3). Bağlanma önce PBP2'ye ve daha sonra PBP1a'ya olmaktadır (7).

### 2.1.2. Meropenem

Meropenem karbapenem grubunun ikinci üyesidir. Karbapenem halkasına 1-β-metil grubu eklenerek elde edilmektedir (3). Sahip olduğu bu yapı sayesinde DHP-I enzimiyle inaktivasyona karşı dayanıklılığı artmaktadır (3,7). Bu nedenle kullanım sırasında imipenemden farklı olarak DHP-I inhibitörüne ihtiyaç duymamaktadır (3,4).

Meropenem, imipeneme benzer bir etki spektrumuna sahip olmakla birlikte özellikle *P.aeruginosa* olmak üzere gram negatif bakterilere karşı daha etkilidir (6).

### 2.1.3. Ertapenem

Ertapenem 2001 yılında geliştirilmiş karbapenem grubu bir antibiyotiktir. Meropenem gibi 1-β-metil yan zincirine sahiptir (3). Aynı meropenem gibi DHP-I enzime dayanıklıdır ve inhibitöre gerek kalmadan kullanılabilir. Ertapenem 2001 yılında geliştirilmiş karbapenem grubu bir antibiyotiktir. Meropenem gibi 1-β-metil yan zincirine sahiptir (3). Aynı meropenem gibi DHP-I enzime dayanıklıdır ve inhibitöre gerek kalmadan kullanılabilir.

İmipenem ve meropeneme kıyasla daha dar bir etki spektrumuna sahiptir. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan bakterilere ve anaeroplara karşı etkilidir (3). Ancak *P.aeruginosa*, *Acinetobacter*, enterokoklar ve penisilin dirençli pnömokoklara etkili değildir (3,4).

Ertapenem, yarılanma ömrünün uzun olması ve yüksek oranda proteinlere bağlanması gibi farmakokinetik özelliklerinden dolayı günde bir kez uygulamaya olanak vermektedir (3,4). Bu da tedavide diğer ilaçlara oranla daha sık tercih edilmesine neden olmaktadır.

## 2.2. Karbapenemlerde Direnç Mekanizmaları

*Enterobacteriaceae* grubu bakteriler gerek toplum kaynaklı gerekse hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en önemli etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu bakterilerde AmpC ve geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerinin üretimi direncin başlıca sebebi olarak kabul edilmektedir. Karbapenemlerin etki spektrumunun geniş olması, bakteriyal membranlardan hızlıca geçebilmesi, AmpC ve GSBL enzimlerine karşı dayanıklı olması gibi sahip olduğu özellikler nedeniyle çoklu ilaç direnci görülen gram negatif bakterilerin tedavisinde ilk sırada tercih edilmektedirler (6,7). Ancak karbapenemlerin sık kullanımı nedeniyle bu ilaçlarda da giderek artan oranlarda olmak üzere direnç görülmeye başlanmıştır (2).

Karbapenemlere karşı üç farklı direnç mekanizması gözlenmektedir.

### 2.2.1. İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşmaması

#### 2.2.1.1. Porin Değişimleri

Bu direnç mekanizması özellikle *P.aeruginosa* izolatlarında karşımıza çıkmaktadır. *P.aeruginosa* suşlarında bulunan ve OprD olarak adlandırılan karbapenem grubu antibiyotikler için özelleşmiş bir porin bulunmaktadır. OprD kaybı sonucunda karbapenemlere karşı direnç gelişmektedir. Bu porin kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında görülmektedir. Bir haftalık imipenem tedavisinin uygulanması sonucunda *P.aeruginosa* suşlarının %50'sinde *oprD* geninde mutasyonların olduğu saptanmıştır (8). *P.aeruginosa*'da OprD kaybı ile oluşan imipenem direnci sadece kromozomal AmpC beta-laktamaz korunduğunda ve tanımlandığında fonksiyon görür. *Enterobacter spp.*'de porin kaybı ve kromozomal AmpC beta-laktamazının yüksek miktarda yapımı ile oluşan imipenem direnci tanımlanmıştır (9). *K.pneumonia*'da ise porin kaybı ile birlikte plazmid kaynaklı AmpC beta-laktamazın (ACT-1) bulunması durumunda imipenem direnci ortaya çıkmaktadır (10).

### 2.2.1.2. Aktif Pompa Sistemlerinin İndüklenmesi

Karbapenemlere karşı en önemli direnç mekanizmalarından bir diğeri bakteri hücrelerinden antibiyotikleri dışarı atan aktif pompa sistemleridir. Gram pozitif ve gram negatif bakterilerde çeşitli pompa gruplarının varlığı bilinmektedir. Bu dışa atım pompa sistemlerinin çoğunluğu dış membranda yer almaktadır.

*P.aeruginosa*'da MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexXY olmak üzere aktif dışa atım pompa sistemleri tanımlanmış ve karbapenem direnci ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (11). Bu pompaların farklı substrat özgüllükleri vardır ve karbapenem direnci üzerine farklı oranlarda etkinlikleri bulunmaktadır (11).

Tek başına atım pompalarının varlığı yüksek düzeyde karbapenem direncine yol açmamakla birlikte diğer direnç mekanizmaları ile birlikte görüldüklerinde direncin artmasında önemli bir etkileri olduğu da kabul edilmektedir (12).

### 2.2.2. Hedef PBP Değişimleri

Karbapenemlere duyarlı olan bakterilerde PBP'ler de meydana gelen değişikliklerle ortaya çıkan direncin bir kaç şekli vardır; bir PBP'nin yüksek miktarda üretimi, düşük afiniteli yabancı bir PBP kazanılması, ve PBP'lerde afinite azalmasına yol açan nokta mutasyonların oluşmasıdır (3). Tek başına nadir görülen bir direnç mekanizmasıdır ve genellikle diğer direnç mekanizmaları ile birlikte görülmektedir.

### 2.2.3. Beta-laktamları Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı (Beta-laktamazlar)

1940 yılında ilk beta-laktamaz olan penisilinazların saptanmasını takiben tanımlanan beta-laktamazların sayısı her geçen gün artmaktadır. Bu artış doğal olarak beta-laktamaz enzimlerinde bir sınıflandırma yapılması gerekliliğini de beraberinde getirmiştir. Bu amaçla günümüze değin farklı sınıflandırmalar yapılmıştır. Günümüzde temel olarak kabul gören iki sınıflandırma sistemi bulunmaktadır. Bunlardan ilki Ambler sınıflandırmasıdır.

Ambler, beta-laktamazları amino asit ve nükleotid dizilerinin benzerliğine göre dört moleküler gruba ayırmaktadır (13,14).

**Sınıf A:** Özellikle penisilinleri hidrolize eden ve aktif bölgelerinde serin amino asiti taşıyan beta-laktamazlardır. Bu nedenle serin penisilinazlar olarak adlandırılırlar.

**Sınıf B:** Metallo-beta-laktamazlar olarak adlandırılmaktadırlar. Aktivasyon gösterebilmek için ise çinko iyonuna bağlı tiyol gruplarına gereksinim duymaktadırlar.

**Sınıf C:** Kromozomal Amp C geni tarafından kodlanması nedeniyle Amp C enzimler olarak da adlandırılan başlıca sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir. Sınıf A'ya benzer şekilde aktif bölgelerinde serin amino asiti taşımaktadırlar.

**Sınıf D:** Oksasilini hidrolize eden serin beta-laktamazlardır.

Günümüzde kullanılan en yeni sınıflandırma ise 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından geliştirilmiştir. Bu sınıflandırma beta-laktamazları substrat profillerine ve biyokimyasal özelliklerine göre gruplandırmaktadır (15). Tablo 2.1'de beta-laktamazların fonksiyonel ve moleküler sınıflandırması görülmektedir.

**Tablo 2.1. Beta-laktamazların sınıflandırılması**

Bush-Jacoby grup	Moleküler Sınıf	Substrat	Klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibisyon	Tanımlayıcı özellik	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	Benzilpenisiline göre sefalosporin hidrolizi daha güçlü; sefamisinleri hidrolize edebilirler	<i>E. coli</i> AmpC P99 ACT-1 CMY-2 FOX-1 MIR-1
1e	C	Sefalosporinler	-	Seftazidim ve sıklıkla diğer oksimino- $\beta$ -laktamların da artmış hidrolizi	GC1 CMY-37
2a	A	Penisilinler	+	Sefalosporinlere göre benzilpenisilin hidrolizi daha güçlü	PC1
2b	A	Penisilinler, erken sefalosporinler	+	Sefalosporin ve benzilpenisilin hidrolizi benzer	TEM-1 TEM-2 SHV-1
2be	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	+	Artmış oksimino- $\beta$ -laktam hidrolizi	TEM-3 SHV-2 CTX-M-15 PER-1 VEB-1
2br	A	Penisilinler	-	Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktama direnç	TEM-30 SHV-10
2ber	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve monobaktamlar	-	Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktama direnç ile kombine artmış oksimino- $\beta$ -laktam hidrolizi	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	+	Artmış karbenisilin hidrolizi	PSE-1 CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, sefepim	+	Artmış karbenisilin, sefepim ve sefiprom hidrolizi	RTG-4

**Tablo 2.1. Beta-laktamazların sınıflandırılması (Devamı)**

<b>Bush-Jacoby grup</b>	<b>Moleküler Sınıf</b>	<b>Substrat</b>	<b>Klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibisyon</b>	<b>Tanımlayıcı özellik</b>	<b>Enzimler</b>
2d	D	Kloksasilin	Değişken	Kloksasilin veya oksasilin artmış hidrolizi	OXA-1 OXA-10
2de	D	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	Kloksasilin veya oksasilin ve oksimino- $\beta$ -laktam hidrolizi	OXA-11 OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Değişken	Kloksasilin veya oksasilin ve karbapenem hidrolizi	OXA-23 OXA-48
2e	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	+	Sefalosporinleri hidrolize eder, aztreonam ile inhibe olmaz	CepA
2f	A	Karbapenemler	Değişken	Artmış karbapenem, sefamisin ve oksimino- $\beta$ -laktam hidrolizi	KPC-2 IMI-1 SME-1
3a	B(B1)	Karbapenemler	-	Karbapenemler dahil geniş spektrumlu hidroliz fakat monobaktam hidrolizi yok	IMP-1 VIM-1 CcrA IND-1
	B(B3)	Karbapenemler	-	Karbapenemler dahil geniş spektrumlu hidroliz fakat monobaktam hidrolizi yok	L1 CAU-1 GOB-1 FEZ-1
3b	B(B2)	Karbapenemler	-	Tercihen karbapenem hidrolizi	CphA Sfh-1

Karbapenemazlar, karbapenem grubu ilaçları hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilmektedir (16). Karbapenemazlar, Ambler sınıflamasında A, B ve D sınıfı beta-laktamazları içeren geniş bir grubu oluşturmaktadır (17). Bunlar sadece karbapenemleri değil neredeyse tüm beta-laktam grubu antimikrobisideri hidrolize edebilen en güçlü beta-laktamazlardır (18). Bu nedenle karbapenem grubundaki beta-laktam antibiyotiklere diğer beta-laktamlara oranla daha yüksek afinite gösteren metalloenzimler "karbapenemaz" olarak adlandırılmaktadır. Sayıları diğer beta-laktamazların sayısı ile karşılaştırıldığında daha düşüktür (19).

1990 öncesinde tanımlanmış olan tüm karbapenemleri hidrolize eden enzimlerin kromozomal olarak bilinmesine rağmen yakın geçmişte Japonya'dan plazmid aracılı MBL'lar bildirilmiştir (20). Karbapenemazlar intrinsik (kromozomal) veya ekstrinsik (kazanılmış) olabilmektedir.

#### **2.2.3.1. Kromozomal (Doğal) Karbapenemazlar**

Ambler Sınıf B'ye ait beta-laktamazlar kromozomal olarak kodlanmakta ve *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Myroides (Flavobacterium) odoratum*, *Elizabethkingia meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii* ve *Bacillus cereus* gibi bakterilerde yaygın olarak bulunmaktadır (21). Bu enzimler diğer gruptakilerden farklı olarak aktif bölgelerinde çinko bulundurmaktadır. Katalitik aktivite çinko iyonuna bağlıdır ve EDTA ile inhibe olmaktadır (22). A, C ve D sınıfına ait beta-laktamazlar çinko iyonunu içermeyip, serin bazlı mekanizmalara sahiptirler. Birkaç istisna dışında bu grupların kromozomal karbapenemaz etkinlikleri bulunmamaktadır (23).

#### **2.2.3.2. Kazanılmış Karbapenemazlar**

Genellikle Ambler sınıflandırmasındaki A, B ve D grubundaki enzimler bu sınıflandırma içerisinde yer alabilmektedir (24). Kazanılmış karbapenemazlar özellikle *Enterobacteriaceae* üyelerinde olmakla birlikte

diğer bakteri gruplarında da görülmekte ve her geçen gün sayıları artmaktadır.

*Enterobacteriaceae* ailesinin bazı üyelerinde kromozomal, bazılarında ise plazmid aracılı karbapenemazlar bulunmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde sık görülen karbapenemazlar Tablo 2.2'de görülmektedir.

**Tablo 2.2.** *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip beta-laktamaz enzimler

Moleküler sınıf (Fonksiyonel Grup)	Gen bölgesi	Enzimler	Organizmalar
A (2f)	Kromozomal	Sme-1, Sme-3, IMI-1, IMI-3, NmcA, SFC-1,	<i>S.marcescens</i> ve <i>E.cloacae</i>
	Plazmid	KPC-2, KPC-13,	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i>
	Plazmid	GES-1, GES-20	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i>
B (3)	Kromozomal/ Plazmid	IMP-1, IMP-33, VIM-1, VIM-33, NDM-1, NDM-6, SPM-1, SIM, GIM, IND-1, IND-7, AIM, DIM, KHM	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> ve diğer non-fermentatif bakteriler
D (2df)	Kromozomal/ Plazmid	OXA-23 grup (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24 grup (OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 grup (OXA-40, OXA-143, OXA-58) OXA-48 grup (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i>

## Sınıf A Karbapenamazlar

Beta-laktam antimikrobiyaller üzerinde geniş hidrolitik etkinliğe sahip olan sınıf A karbapenamazlar, serin beta-laktamaz yapısındadır. Bu enzimler karbapenemlere ek olarak aztreonamı, penisilinleri ve sefalosporinleri de hidrolize edebilirler (25). Bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile kısmen inhibe olabilirler (1). *Enterobacteriaceae* ailesinde tanımlanan en önemli tipleri IMI/NMC, SME, GES ve KPC'dir (26).

IMI ("İmipenem-hydrolyzing") enzim ailesi genellikle Nmc-A ("Not metalloenzyme carbapenemase") enzimiyle birlikte bulunmaktadır. IMI-1 ilk kez 1996'da *Enterobacter cloacae* izolatında, IMI-2 ise 2005 yılında *Enterobacter asburiae* izolatında tanımlanmıştır (27,28). IMI/NMC enzim kümesi kromozomal olarak kodlanmaktadır (27).

SME enzimleri ismini ilk olarak izole edildiği *Serratia marcescens* bakterisinden almıştır (29). Kromozomal olarak kodlanan SME enzimleri arasında sadece bir aminoasit farklılığı bulunmaktadır. Bu enzimler Amerika kıtasında bulunan ülkelerde karbapenem direnci açısından problem yaratmaktadır ve bu nedenle tarama testlerinin yapılması önerilmektedir (30-32).

SME ve IMI/NMC enzim kümesi Bush sınıf 2f grubu içerisinde sınıflandırılmaktadır (32,33). GES ("Guiana Extended Spectrum") enzimleri de bu grup içerisinde yer alıp plazmid aracılı kodlanmaktadır. GES-1 karbapenamaz aktivitesine sahip olmamakla birlikte bu grupta yer alan diğer üyelerin de zayıf da olsa karbapenamaz aktivitesi gözlenmektedir (34). GES enzimleri *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* izolatlarında tanımlanmıştır (35). *P.aeruginosa*'da tanımlanan GES-2 enzimi nokta mutasyonu sonucunda GES-1'den oluşmuş bir enzimdir (24). GES-3 ve GES-4 enzimleri aztreonama gösterdikleri direnç nedeniyle diğerlerinden farklılık göstermektedir (36).

A sınıfı karbapenemazların en önemli ve en yaygın görülen üyesi KPC grubu enzimlerdir. KPC enzimi ilk olarak 1996'da Kuzey Carolina'da *K.pneumoniae* klinik izolatında tanımlanmıştır (37). Daha sonraki yıllarda New York şehrinde KPC pozitif *K.pneumoniae* ile meydana gelmiş bir salgın bildirilmiştir (38.) Amerika'dan sonra İsrail'de ve Yunanistan'da da KPC kaynaklı hastane salgınları bildirilmiştir (39,40). KPC enzimleri ile ilişkili olguların Güney Amerika ve Çin'den de rapor edilmesi ile KPC global bir problem haline dönüşmüştür (41). Bunun üzerine yapılan çalışmalarda *K.pneumoniae* ST258 klonunun KPC enziminin dünya genelindeki yüksek insidansına katkıda bulunmuş olabileceği bildirilmiştir (42,43). KPC enzimlerinin hepsi plazmid aracılı kodlanmakta olup tüm beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gösterirler (37).

### **Sınıf B karbapenemazlar: Metallo-beta-laktamazlar**

Klinik olarak değerlendirildiğinde sınıf B karbapenemazlar en önemli enzim grubudur. Aktif bölgelerinde çinko iyonu bulundurdukları için metallo-beta-laktamaz (MBL)'lar olarak da isimlendirilirler. Bu karbapenemazlar Ambler Sınıf B veya Bush Grup 3'de yer almaktadır (44). Sahip oldukları metal iyonu sayesinde bu enzimler EDTA, dipikolinik asit gibi metal şelatörleri ile inhibe edilirler ve bu özellikleri tanımlanmalarında kullanılır (45). Tüm dünyada yaygın olarak görülen ve klinikte problem yaratan B grubu karbapenemazların en bilinen üyeleri IMP, VIM ve NDM enzimleridir.

Metallo-beta-laktamazların yayılımını gösteren pek çok çalışma yapılmıştır. İlk olarak bu enzimler *B.cereus*, *Aeromonas spp.* ve *S.maltophilia* gibi enfeksiyon etkeni olarak daha az sıklıkta karşılaşılan suşlarda gösterilmiştir (46-48). Daha sonra yapılan çalışmalarda pek çok *Enterobacteriaceae* ailesi üyesinde, *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* gibi non-fermentatif bakterilerde de bu enzimlerin varlığı tespit edilmiştir (49,50). Bu grup içerisinde yer alan karbapenemazların hem kromozomal hem de plazmid aracılı aktarılabilmesi dünya üzerindeki yaygınlıklarının en önemli nedeni olarak görülmektedir.

IMP-1 beta-laktamazı ilk olarak Japonya'da bir *P. aeruginosa* izolatından daha sonra da bir *S.marcescens* suşundan izole edilmiştir (51,52). Bundan çok kısa bir süre sonra Asya ve Avrupa'dan da IMP tipi karbapenemazlar bildirilmiştir (53-55). IMP enzimlerinin sınıf 1 integronlarla ilişkili olduğu doğrulanmış bazı sporadik olgularda sınıf 3 integronlarla ilişkisi de bildirilmiştir (56).

Bir diğer metallo-beta-laktamaz enzim ailesi üyesi VIM enzimleridir. Bunlar ilk kez 1997'de İtalya'da bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır (57). İsmi de Verona şehrinden almıştır. Daha sonra VIM-2 Fransa ve Yunanistan'da, VIM-3 ise Tayvan'da yine *P.aeruginosa* izolatlarında gösterilmiştir (58). ABD, Kuzey Avrupa, Tunus, Güney Kore, Venezuela gibi dünyanın çeşitli yerlerinde VIM enzimlerinin bildirildiği çalışmalar yapılmıştır (59-61). Ancak bu enzimler özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olarak görülmüş ve Yunanistan'da önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir (62,63).

NDM enzimleri son dönemlerde tüm dünyanın ilgisini çeken diğer bir metallo-beta-laktamaz grubudur. NDM-1 enzimi ilk olarak 2007 yılında İsveç'te Hindistan'a seyahat öyküsü olan ve orada hastanede yatış öyküsü bulunan bir hastada gösterilmiştir (64). Enzim grubu adını da bu hastanın ilk olarak tedavi edildiği New Delhi kentinden almıştır. Özellikle Hindistan, Pakistan ve bu ülkelerden sıkça göç alan İngiltere gibi ülkelere bu enzim bildirilmiştir (65). Bunun yanı sıra son yıllarda tüm dünyada NDM pozitif izolatlar tanımlanmaya başlamıştır (66,67).

NDM-1 plazmidi, karbapenemlerin yanı sıra diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde etkili olmasına rağmen, bulunduğu bakterinin sadece tigesiklin, fosfomisin ve kolistine karşı azalmış duyarlılık göstermesine neden olmaktadır (68). NDM-1 enzimi sıklıkla *K.pneumoniae* izolatlarında saptanmasına rağmen son yıllarda özellikle toplum kökenli *E.coli* izolatlarında da tespit edilmektedir (69). NDM enzimleri sadece *K.pneumoniae* ve *E.coli*

izolatlarında değil *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan diğer bakterilerde de saptanmaktadır (65,70).

Bu grup içerisinde sayılan IMP, VIM ve NDM enzimlerinin dünya üzerindeki yayılımı hızla artmaktadır ve bu da dirençle beraber tedavi problemlerini de gündeme getirmektedir (71).

### **Sınıf D karbapenemazlar: Oksasilinazlar**

Bir diğer serin beta-laktamaz grubu olan oksasilinazlar, fonksiyonel olarak oksasilin ve kloksasilini hidrolize edebilen penisilinazlar olarak tanımlanmaktadır (16). Bu enzimler Bush ve Jacoby'nin yaptıkları sınıflandırmada 2df grubunda yer alan ve karbapenemaz aktivitesi bulunan OXA (oksalinaz) enzimleri olarak da tanımlanabilmektedir (15).

Bu enzim grubunda karbapenemaz aktivitesi ilk kez 1993'de *A.baumannii* izolatında tanımlanmıştır ve ARI-1 ("*Acinetobacter* resistant to imipenem") olarak adlandırılmıştır (72). Ancak daha sonra DNA dizi analizi sonucunda bu enzimin OXA grubuna ait olduğu tespit edilmiş ve OXA-23 olarak adlandırılmıştır (73).

Bu enzim ailesinin en önemli üyeleri OXA-23, 24, 27, 25, 26, 40, 48, 51, 58, 66, 69 ve 143'tür. Bu grup içerisinde özellikle gram negatif basillerde gösterilmiş bir çok varyant enzim mevcuttur. Genellikle kromozomal olarak kodlanmasına rağmen OXA-23 ve OXA-48'in plazmidlerle de taşınabildiği gösterilmiştir (74,75).

*Enterobacteriaceae* ailesinde en sık görülen oksasilinaz OXA-48'dir. İlk olarak 2001 yılında Türkiye'den izole edilen bir *K.pneumoniae* suşunda gösterilmiştir (76). Daha sonra Türkiye'den hastane salgınları da bildirilmiştir (77). OXA-181 ise OXA-48 geninin nokta mutasyonu ile oluşmuş, plazmid aracılı kodlanan diğer bir önemli enzimdir (78,79). Dünyanın farklı coğrafyalarından OXA-48 izolasyonlarının bildirilmesi bunun global boyutta bir problem olduğunun en belirgin örneğidir (80-82). Bu enzimin Avrupa'daki yayılımından konjugatif bir plazmid sorumlu tutulmasına rağmen OXA-48

sentezleyen *K.pneumoniae* ST395 suşunun Fas, Fransa ve Hollanda'da tanımlanması klonal yayılımın da olabileceğini düşündürmektedir (74,75).

OXA-48 enziminin ilk kez ülkemizde tanımlanmış olması ve Avrupa'da ülkemizin epidemiyolojik durumunun özellikle OXA-48 tipi karbapenemaz direnci için düzey 5 olarak belirlenmesi ülkemizde bu direncin önemini artırmaktadır (16).

### 2.3. Türkiye'de Karbapenemaz Epidemiyolojisi

Karbapenemazların ve bunlara bağlı gelişen antibiyotik direncinin tüm dünyada var olduğu bilinmektedir. Dünya genelinde epidemi boyutlarına ulaşan yayılımı göz önüne alındığında ülkemizde de karbapenemaz üreten suşların varlığı yadsınamaz bir gerçektir. Türkiye'de bu konuyla ilgili yapılan çalışmalar ne yazık ki oldukça sınırlı sayıdadır. Sayısı oldukça az olan bu çalışmalara ve yurt dışındaki merkezlerle ortak yapılan çalışmalara bakıldığında ülkemizde de karbapenemazların önemli bir sağlık problemi haline dönüştüğü görülmektedir.

Ülkemizde karbapenemazlar ile ilk tanışma 2001 yılında İstanbul'da 54 yaşındaki bir hastanın idrar kültüründen izole edilen *K.pneumoniae* 11978 suşu ile olmuştur (76). Bu izolat tüm dünyada rapor edilen oksasilinaz sentezleyen karbapenem dirençli ikinci *Enterobacteriaceae* üyesidir. 2003 yılında ise Elazığ'dan karbapenemaz pozitif bir *P.aeruginosa* izolatı raporlanmıştır (83). Bu çalışmaları takip eden süreçte Toraman ve ark. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığını araştırdıkları çalışmalarında, *Pseudomonas* suşlarının %24'ünde, *Acinetobacter* suşlarının ise %21'in de metallo-beta-laktamaz enzimi saptamışlardır (84).

Bu olguları takip eden yıllarda Türkiye'den karbapenem direnci ve karbapenemaz tipleri üzerinde yapılan araştırmalara devam edilmiştir ve çeşitli çalışmalarda farklı karbapenemaz tipleri raporlanmaya başlanmıştır. 2003 yılında Bahar ve ark. tarafından kardiyovasküler cerrahi geçirmiş 53

yaşındaki bir hastanın solunum yolundan alınan örnekte VIM-5 tipi metallo-beta-laktamaz üreten *P.aeruginosa* suşu raporlanmıştır (85). 2005 yılında yayınlanmış başka bir çalışmada ise önceki yıllara ait izolatlarda VIM-5 enziminin varlığı tespit edilmiştir (86). Yapılan bu çalışmalar ile gösterildiği üzere ülkemizde daha önceki yıllarda da klinik örneklerdsen izole edilen suşların karbapenemaz enzimlerini içerdiği anlaşılmaktadır. Ülkemizde karbapenem direncinin yüksek olması bu alanda yapılacak çalışmaların ne kadar önemli olduğunu da göstermektedir.

Aktaş ve ark. tarafından 2003 yılında bir yaşındaki nöroblastomalı bir hastanın kan kültüründen izole edilen *K.pneumoniae* suşunda IMP-1 enzimi gösterilmiştir (87). SENTRY programının 2006 yılında yayınladığı duyarlılık raporunda da ülkemizden giden 11 tane *E.cloaceae* suşunda IMP-1 enziminin tespit edildiği raporlanmıştır (88)

Diğer karbapenemaz enzimlerine bakıldığında NDM enzimi ile ilgili yapılan çalışmalar daha sınırlı sayıda kalmaktadır. 2015 yılında yayınlanan bir çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde NDM-1 prevalansı %10,5 olarak raporlanmıştır (89). 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada da *K.pneumoniae* izolatlarında NDM-1 enziminin genel dağılımdaki oranı %19 olarak raporlanmıştır (90). Yapılan bu çalışmalarda görüldüğü gibi NDM-1 enzimi artan oranlarda yayılım göstermektedir.

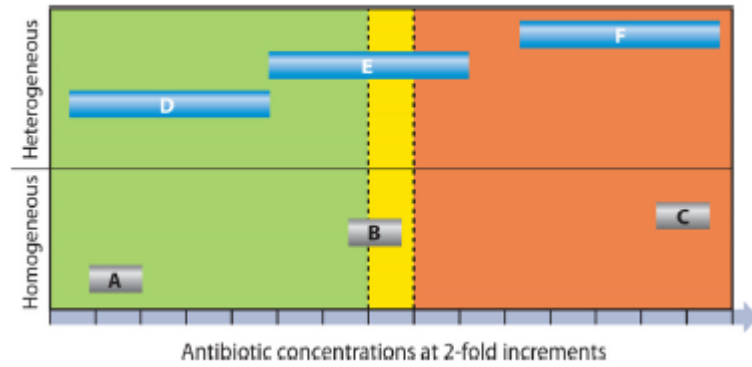
A sınıfı karbapenemazlara bakacak olursak, bu grubun en önemli temsilcisi olan KPC enzimi 2014 yılına kadar ülkemizden bildirilmemiştir. Labarca ve ark. Türkiye'den 80 yaşındaki bir hastadan izole edilen ve KPC-2 sentezleyen bir *K.pneumoniae* izolatını 2014 yılında bildirmişlerdir (91). Çalışmacılar OXA-48 enziminin endemik olduğu bir bölgede KPC-2 varlığının tespit edilmesini endişe verici olarak değerlendirmişlerdir. A sınıfı karbapenemaz grubunun diğer bir üyesi olan GES enzimi ise 2010 yılında Türkiye'den Belçika'ya giden bir hastadan izole edilen *A.baumannii* suşunda gösterilmiştir (92). Daha sonraki yıllarda farklı çalışmalarda da *A.baumannii* izolatlarında GES enziminin varlığı gösterilmiştir (93,94).

Yapılan çalışmalarla Türkiye'de farklı karbapenemaz tiplerinin bulunduğu ortaya koyulmuştur. Ancak yapılan bir çok çalışmada gösterildiği gibi ülkemizde en yaygın görülen enzim OXA-48'dir (77,95,96). 2012 yılında yayınlanan bir derlemede ülkemiz OXA-48'in endemik olduğu bir bölge olarak tanımlanmıştır (74).

#### **2.4. Karbapenemazlarda Heterojen direnç**

Heterojen direnç kavramının tüm mikroorganizmaları kapsayan belirgin bir tanımı olmamasına rağmen bu kavram oldukça yaygın kullanılmaktadır. Basitçe tanımlayacak olursak, geleneksel in-vitro antibiyotik duyarlılık yöntemleri ile genellikle duyarlı bulunan bakteri popülasyonunun bir alt kümesinin aynı ilaca karşı duyarlılığının azalması ya da direnç göstermesidir. Çeşitli faktörler bu alt popülasyonun proliferasyonuna ve bunu takiben tamamen dirençli bir suşun ortaya çıkmasına neden olabilmektedir (97). Antibiyotik direncinin giderek arttığı günümüzde bir çok çalışma, dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olabilecek prekürsör evre olarak kabul edilen heterojen direnç fenomeni üzerinde durmaktadır (98).

Heterojen direnç tanımı, bir bakteri popülasyonunun farklı direnç düzeylerine sahip alt popülasyonları içerdiği anlamına gelir, ancak bir antibiyotiğe karşı tüm popülasyonun duyarlı ya da dirençli olduğu durumları kapsamaz (99). Şekil 2.1'de görüldüğü üzere, bir bakteri popülasyonunun tümü bir antibiyotiğe karşı duyarlıyken farklı MİK değerlerine sahip alt gruplar içerebilir. Bu alt grupların hepsi o antibiyotiğe karşı hala duyarlılık sınır değerleri içindedir (D). Aynı şekilde bir bakteri popülasyonunun tümü bir antibiyotiğe karşı dirençliyken farklı MİK değerlerine sahip alt gruplar içerebilir. Bu alt grupların hepsi de o antibiyotiğe karşı dirençlidir (F). Bu durumların saptanması klinik açıdan daha az önem teşkil etmektedir. Ancak bakteri alt popülasyonlarının bir kısmının duyarlı bir kısmının dirençli (E) olarak saptanması tedavi başarısızlığı açısından son derece önemlidir.



**Şekil 2.1.** Bakterilerin antibiyotiklere karşı heterojen ya da homojen şekilde görülen cevabı (99)

*Staphylococcus aureus*, koagülaz negatif stafilokok (100), *A.baumannii* (101), *Mycobacterium tuberculosis* (102), *Streptococcus pneumoniae* (103), *Enterococcus faecium* (104) ve *Cryptococcus neoformans* (105) gibi birçok bakteride heterojen direnç fenomeni görülmüştür. Heterojen direncin sıklığı türler arasında farklılık göstermekle birlikte her  $10^{-7}$  –  $10^{-3}$  de bir sıklıkta olmak üzere dirençli bir subpopülasyon içeren suşlar görüldüğü belirtilmektedir (103).

Heterojen direnç ile ilgili birçok in-vitro çalışma yapılmasına rağmen, bu direncin klinik önemi tam olarak açıklanamamıştır. Bunun nedeni, suşun belirli bir antibiyotiğe karşı in-vitro direncinin gösterilmesine rağmen klinik olarak öneminin henüz tam olarak anlaşılabilmesidir (97). Charles ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada, vankomisine heterojen dirençli *S.aureus* izolatlarının neden olduğu bakteriyemilerin vankomisine duyarlı MRSA (Metisiline Dirençli *S.aureus*) bakteriyemilerine oranla daha yüksek bakteri yüküyle seyrettiği ( $p=0.001$ ); bu bakteriyemilerin daha yüksek oranda vankomisin tedavi başarısızlığıyla sonuçlandığı ( $p<0.001$ ) gösterilmiştir (106). *Salmonella* Typhimurium suşları üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise in-vitro olarak antibiyotiğe direnç gösteren suşların avirülan olduğu tespit edilmiştir (107). Bu nedenle, heterojen dirençli suşların tedavi başarısındaki rolü tam olarak ön görülememektedir. Dirençli suşların in-vitro olarak ortaya

çıkması, mutlaka terapötik etkilere sahip olmayabilir. Bakteriler antibiyotik direncini kazanırken virülans özelliklerini kaybedebilirler.

Karbapenem grubu ilaçlar özellikle diğer antibiyotiklere direnç gösteren *Enterobacteriaceae* suşları için önemli bir tedavi seçeneğidir. Ancak bu antibiyotiklerin yoğun kullanımına bağlı olarak artan oranlarda direnç görülmektedir. Doğal olarak heterojen direnç kavramı karbapenemler için de araştırılmaya başlanmıştır. Pournaras ve ark. 2005 yılında yayınladıkları bir çalışmada *A.baumannii* suşları arasında karbapenemlere karşı heterojen direnç olduğunu saptamışlardır (108). 2010 yılında yaptıkları başka bir çalışmada ise meropeneme duyarlı *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz (KPC) üreten ve meropeneme heterojen dirençli alt popülasyonlar olduğunu göstermişlerdir (109).

*Enterobacteriaceae* ailesinde heterojen direncin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Bunlar içinde en sık *K.pneumoniae* izolatlarında heterodirenç varlığı araştırılmıştır. Günümüzde *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan ve VIM-1, KPC, OXA-48, NDM-1 olmak üzere farklı karbapenemaz enzimlerine sahip olan izolatlarda heterojen direnç varlığı raporlanmıştır (63,109,110).

Yapılan çalışmalar heterojen direncin varlığını ortaya koyarken aynı zamanda bu konu ile ilgili yeni çalışmaların yapılması gerekliliğini de vurgulamaktadır. Hem direncin yayılımı hem de tedavi başarısı açısından heterojen direnç araştırılması gereken yeni bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. İzolatlar

Ocak 2016 – Ağustos 2018 tarihleri arasında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Klinik Patoloji Laboratuvarı Bakteriyoloji Ünitesine gönderilen kan kültürü örneklerinden izole edilen 301 *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. Bu izolatlar çalışma süresince %15 gliserollü BHIB (“Brain Heart Infusion Broth”) besiyeri içerisinde -20°C’de saklanmıştır.

#### 3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilen her izolata, EUCAST (“European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing”) (111) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ertapenem, imipenem ve meropenem antibiyotik duyarlılıklarına bakılmıştır. Eş zamanlı olarak gradient test yöntemi (Etest, bioMérieux, Fransa), Sensititre® mikrodilüsyon (ThermoScientific, USA) ve Phoenix (Becton Dickison, USA) cihazı ile de antibiyotik duyarlılıkları tespit edilmiştir.

Kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 ve *K.pneumoniae* ATCC 700603 suşları kullanılmıştır.

##### 3.2.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

Bu yöntem için 10 µg ertapenem, imipenem ve meropenem içeren antibiyotik diskleri (Becton Dickison, USA) kullanılmıştır. Diskler, kullanılıncaya kadar +4°C’de muhafaza edilmiştir.

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi için, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar (MHA) (Becton Dickison, USA) üzerine steril bir eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Agar yüzeyinin kurumaması beklendikten sonra, oda sıcaklığına getirilmiş antibiyotik diskleri besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. Etüvde 35±2°C’de 18-24 saat

inkübe edildikten sonra disk çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür

Elde edilen zon çapları EUCAST kılavuzu önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir (111).

### **3.2.2. Gradient Test Yöntemi**

Ertapenem, imipenem ve meropenem MİK değerlerinin gradient test yöntemi ile saptanması için 0.002-32 µg/ml aralığında ertapenem, imipenem ve meropenem içeren gradient test şeritleri (Etest, bioMérieux, Fransa) kullanılmıştır. Bu şeritler, kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

Gradient test yöntemi için, 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA besiyeri üzerine steril bir eküvyon yardımı ile yayılmıştır. Agar yüzeyinin kuruması beklendikten sonra, oda sıcaklığına getirilmiş gradient test şeritleri besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. Etüvde 35±2°C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra ertapenem, imipenem ve meropenem MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Elips şeklindeki inhibisyon zonunun gradient test şeridi ile kesiştiği bölgedeki değer, MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Elde edilen MİK değerleri EUCAST kılavuzu önerilerine göre değerlendirilmiştir (111).

### **3.2.3. Sensititre® Mikrodilüsyon Yöntemi**

Meropenem MİK değerinin belirlenmesi için, ticari olarak üretilmiş Sensititre® antibiyotik duyarlılık mikroplakları (ThermoScientific, USA) kullanılmıştır. Mikroplaklar 0.12-16 µg/ml aralığında meropenem içermektedir.

Panel içerisinde bulunan distile su kullanılarak 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonundan 30 µl alınarak 11 ml Sensititre® Mueller-Hinton sıvı besiyeri içeren tüplere eklenmiştir. Hazırlanan bu süspansiyon Sensititre® mikroplak kuyucuklarına 50 µl olacak

şekilde dağıtılmıştır. Etüvde  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra MİK sonuçları değerlendirilmiştir. Üremenin olmadığı son kuyucuk MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

#### **3.2.4. Otomatize Sistem**

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların karbapenem duyarlılıkları Phoenix (Becton Dickinson, USA) otomatize sistemi ile de çalışılmıştır. Bu amaçla NMIC panelleri kullanılmıştır. Paneller ve çalışma için kullanılacak buyyonlar kullanılana kadar oda ısısında muhafaza edilmiştir. AST indikatör ise  $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Çalışmaya başlamadan önce her seferinde Phoenix Spec Nephelometer cihazı kalibre edilmiştir. ID Buyyon kullanılarak hazırlanan bakteri süspansiyonlarının bulanıklıklarının ölçümü bu cihaz kullanılarak yapılmıştır. AST indikatörü oda ısısına getirildikten sonra bir damla AST Buyyon içerisine damlatılmış ve homojen olacak şekilde karışması sağlanmıştır. 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanan ID Buyyondan 25 µl alınarak AST Buyyon içerisine ilave edilmiştir. Hazırlanan AST Buyyon NMIC paneline aktarılmıştır. Kapağı kapatılan panel dik konumda ve 30 dk. içerisinde Phoenix cihazına yerleştirilmiştir. Yirmi dört saat sonra sonuçlar değerlendirilmiştir.

### **3.3. Karbapenemaz Aktivitesinin Belirlenmesi**

#### **3.3.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM Testi)**

Karbapenemaz varlığının hızlı tespit edilebilmesi için CIM testi uygulanmıştır. İncelenen izolatlardan bir öze dolusu bakteri kolonisi alınarak 400 µl distile su içerisinde süspansiyonları hazırlanmış ve 10 µg'lık meropenem diski bu süspansiyon içerisine eklenmiştir. İki saat  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildikten sonra meropenem diskleri bakteri süspansiyonlarının içerisinden çıkarılmıştır. Karbapenem duyarlı *E.coli* ATCC 25922 izolatının 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu hazırlanarak MHA plağına yayılmıştır. Agar yüzeyinin kurumaması beklendikten sonra meropenem diskleri

yerleştirilmiştir. MHA plakları  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de  $\geq 6$  saat inkübasyon süresinin ardından değerlendirilmiştir. Disk çevresinde inhibisyon zonu görülmeyen izolatlar için CIM testi pozitif, inhibisyon zonu görülenler için ise negatif olarak yorumlanmıştır.

### 3.3.2. Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testi CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) kılavuzu önerileri doğrultusunda uygulanmıştır (112).

*E.coli* ATCC 25922 suşunun 0,5 McFarland standart süspansiyonu 1/10 oranında sulandırılarak MHA plağının yüzeyine disk difüzyon yönteminde olduğu gibi steril eküvyon kullanılarak yayılmıştır. Agar yüzeyinin kuruması beklendikten sonra 10 µg'lık meropenem diski plağın merkezine yerleştirilmiştir. Test edilecek izolat, diskin kenarından başlayarak plağın dışına doğru öze ile düz bir hat boyunca çizgi şeklinde ekilmiştir. Plaklar  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 16-20 saatlik inkübasyonun ardından değerlendirilmiştir.

Karbapenem diski etrafında oluşan inhibisyon zonunun test edilen izolatın ekim çizgisine doğru girinti yapması ya da yonca yaprağı görünümünün oluşması, "karbapenemaz üretimi pozitif" olarak değerlendirmiştir.

### 3.3.3. Karbapenemaz Konfirmasyon Disk Difüzyon Yöntemi

Karbapenemaz varlığını ve tipini tespit etmek için kullanılan ticari olarak üretilmiş konfirmasyon kitleri bulunmaktadır. Bu çalışma kapsamında ise "KPC/MBL and OXA-48 Confirm Kit" (Rosco Diagnostica, Danimarka) kullanılmıştır. Kit içerisinde 10 µg'lık meropenem, meropenem + dipikolinik asit, meropenem + fenilboronik asit, meropenem + kloksasilin ve 30 µg'lık temosilin olmak üzere 5 farklı disk bulunmaktadır. Bu yöntemde disk difüzyon yönteminde olduğu gibi 0.5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA besiyerine yayılmıştır. Agar yüzeyinin kuruması beklendikten sonra, kit içerisindeki antibiyotik diskleri besiyerinin yüzeyine yerleştirilmiştir. Etüvde  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra disk

çevresinde oluşan inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda inhibisyon zon çapları arasındaki farklılıklara göre karbapenemaz enzimlerinin tiplendirilmesi yapılmıştır. Karbapenemaz konfirmasyon disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** Karbapenemaz konfirmasyon disk difüzyon yöntemiyle elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan kriterler

		<b>MRPBO</b>	<b>MRPDP</b>	<b>MRPCX</b>	<b>Temosilin 30 µg</b>
<b>AmpC + porin kaybı</b>	MRP10	≥ 4mm	≤ 3mm	≥ 5mm	≥ 12mm
<b>GSBL + porin kaybı</b>	MRP10	≤ 3mm	≤ 3mm	≤ 3mm	≥ 12mm
<b>KPC</b>	MRP10	≥ 4mm	≤ 3mm	≤ 3mm	Değişken
	MRPCX	≥ 4mm	-	-	-
<b>MBL</b>	MRP10	< 4mm	≥ 5mm	≤ 3mm	Değişken
<b>OXA-48</b>	MRP10	≤ 3mm	≤ 3mm	≤ 3mm	İnhibisyon zonu yok

MRP10: Meropenem 10µg, MRPBO: Meropenem 10µg+fenilboronik asit,  
MRPDP: Meropenem 10µg+dipikolinik asit, MRPCX: Meropenem 10µg+kloksasilin

### 3.4. Karbapenemazların Genotipik Yöntemle Araştırılması

Çalışmaya dahil edilen izolatlardan DNA izolasyonu yapıldıktan sonra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi kullanılarak OXA-48, NDM-1, KPC, VIM ve IMP olmak üzere 5 farklı karbapenemaz enzim varlığı araştırılmıştır.

### 3.4.1. Bakteriyel DNA'nın Ekstraksiyonu

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, çalışmaya başlamadan önce suşların tümü  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılmış, kanlı agar besiyerine en az iki kez subkültürleri yapılmıştır.

Taze pasajları yapılan bakteri izolatlarından DNA izolasyonu için QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılmıştır. Kit içerisindeki DNA izolasyon protokolü uygulandıktan sonra elde edilen bakteri DNA'sının bulunduğu sıvı, steril ependorflara alınmıştır. PZR işlemi uygulanana kadar DNA ekstraksiyonları  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

### 3.4.2. Primerlerin Hazırlanışı

OXA-48, NDM, VIM, IMP ve KPC gen bölgelerinin amplifikasyonu için beş farklı primer seti kullanılmıştır. Liyofilize halde bulunan primerlerin sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda protokole uygun olarak yapılmış ve  $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$  konsantrasyonda stok primerler elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak primerlerin konsantrasyonu  $10\text{ pmol}/\mu\text{l}$  olarak planlanmıştır. Bunun için  $100\text{ pmol}/\mu\text{l}$  konsantrasyonda stok primerden  $10\text{ }\mu\text{l}$  alınarak  $90\text{ }\mu\text{l}$  distile su ile toplam hacim  $100\text{ }\mu\text{l}$  olacak şekilde tekrar sulandırılmış, ependorflara ayrılıp  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edilmiştir.

Çalışmada kullanılan primerler Monteiro ve ark (113) ile Ellington ve ark. (114)'nin çalışmalarına uygun olarak belirlenmiştir. Karbapenem direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerlerin dizilimleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

**Tablo 3.2.** Karbapenem direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primer dizileri

Hedeflenen gen bölgesi	Hedef Primer Adı	Primer dizilimi (5'-3')	PZR ürününün büyüklüğü (bp)
<i>bla</i> OXA-48	OXA-48-F OXA-48-R	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTTCGC	177
<i>bla</i> NDM-1	NDM-F NDM-R	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	82
<i>bla</i> KPC	KPC-F KPC-R	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	785
<i>bla</i> VIM	VIM-F VIM-R	GATGGTGTTTGGTTCGCATA CGAATGCGCAGCACCAG	390
<i>bla</i> IMP	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATCT	188

### 3.4.3. PZR İle Gen Bölgelerinin Amplifikasyonu

Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı ve döngü koşulları Monteiro ve ark. (113) ile Ellington ve ark. (114)'nın çalışmasına uygun şekilde seçilmiştir. PZR karışımı için *Taq* PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Germany) kullanılmıştır. *Taq* PCR Master Mix, *Taq* DNA Polimeraz, PZR Tamponu ve dNTP'leri içermektedir. Çalışmada kullanılan PZR reaksiyon karışımı Tablo 3.3'de verilmiştir.

Elde edilen PZR ürünlerinin büyüklükleri Tablo 3.2'de baz çifti (bp) olarak verilmiştir.

**Tablo 3.3** PZR reaksiyon karışımı

Master Mix	12,5 µl
Coraload	2,5 µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
DNase Free Water	7 µl
DNA	1 µl
<b>TOPLAM</b>	<b>25 µl</b>

Her gen bölgesi için belirlenmiş olan primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.4'de verilmiştir.

**Tablo 3.4.** Tüm gen bölgesi için kullanılan PZR protokolü

94°C	3 dk	1 siklus
94°C	30 sn	35 siklus
60°C	30 sn	
72°C	1 dk	
72°C	10 dk	1 siklus

#### 3.4.4. Agaroz-Jel Elektrofrez

Amplifikasyon işlemi sonucunda elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektrofrez yöntemi kullanılarak incelenmiştir. Bunun için % 1,5'lik agaroz jel kullanılmıştır. Jeli hazırlamak için TAE (Tris-Asetik Asit-EDTA) çözeltisinden 150 ml alınarak içerisine 2,25 g agaroz eklenmiştir. Hazırlanan çözelti 3-5 dk

mikrodalga fırında kaynatılarak agarozun tam olarak çözülmesi sağlanmıştır. Daha sonra içerisine 5 µl etidyum bromür (Sigma, USA) eklenmiştir.

Yatay jel elektroforez tablasının içine yükleme kuyucuklarının oluşması için taraklar yerleştirildikten sonra sıvı haldeki jel karışımı tablanın içerisine yavaşça, kabarcık oluşturmayacak şekilde dökülmüştür. Jel katılaşması için oda sıcaklığında 30 dk. bekletilmiştir.

Katılaştıran jel içerisinden taraklar yavaşça çıkarılmış ve jel elektroforez tankının içerisine yerleştirilmiştir. Jel yerleştirildikten sonra elektroforez tankı jel yüzeyini örtecek şekilde TAE tamponu ile doldurulmuştur. Hazırlanan PZR ürünleri kuyucuklara 5'er µl yüklenmiştir. Moleküler belirteç ve örneklerin jelle yükleme işlemi tamamlandıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılarak güç kaynağına bağlanmıştır. Örnekler 120 V elektrik akımında 45-50 dakika yürütülmüştür.

Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel transillüminatör cihazına (UVP BioSpectrum Multispectral Imaging System, USA) yerleştirilerek ultraviyole ışık altında değerlendirilmiştir. PZR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin büyüklüklerinin değerlendirilmesinde moleküler belirteç olarak 50 bp DNA ladder (ThermoScientific, USA) kullanılmıştır.

### **3.5. Heterojen Direnç Gösteren İzolatların Saptanması**

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların disk diffüzyon testi ve gradient test yöntemi sonuçları değerlendirilmiştir. Bunun sonucunda ertapenem, imipenem ve/veya meropenem disk inhibisyon zonu içinde ya da ertapenem, imipenem ve/veya meropenem gradient şeritlerinin etrafında oluşan inhibisyon bölgesi içinde koloni oluşumu görülen izolatlar heterodirenç açısından değerlendirmeye alınmıştır (63, 109, 115-117).

### 3.5.1. 'Popülasyon Analiz Profili' (PAP) Yöntemi

Popülasyon analiz profili yönteminde (PAP), test edilmek istenen suşlarının sıvı besiyerinde hazırlanan süspansiyonlarından, artan konsantrasyonlarda meropenem ve ertapenem içeren (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µg/ml) MHA besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922, *K.pneumoniae* ATCC 700603 ve *P.aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanılmıştır.

Test edilecek izolatlardan 3 farklı koloni alınarak Mueller Hinton sıvı besiyerine (MHB) ekilmiş 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra  $\sim 10^8$  cfu/ml (A) (0.5 McFarland) bakteri içeren süspansiyonları hazırlanmıştır. Aynı tarafta 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine (*Eppendorf*) 900'er µl serum fizyolojik (SF) dağıtılmıştır. Her bir izolat için 5 adet, 900 µl SF içeren mikrosantrifüj tüpü kullanılmıştır. Ana bakteri süspansiyonu vorteks ile karıştırılmış ve bu süspansiyondan 100 µl alınarak, 900 µl SF içeren ilk mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Böylece bakteri süspansiyonu 10 kat seyreltilerek ilk mikrosantrifüj tüpünün  $\sim 10^7$  cfu/ml kadar bakteri içermesi sağlanmıştır. Bu mikrosantrifüj tüpü de vorteks ile karıştırılmış ve 100 µl alınarak ikinci mikrosantrifüj tüpüne aktarılmıştır. Bu işlem beşinci mikrosantrifüj tüpüne kadar devam ettirilerek  $10^7$ (B),  $10^6$ (C),  $10^5$ (D),  $10^4$ (E) ve  $10^3$ (F) cfu/ml'lik bakteri süspansiyonları elde edilmiştir. 'F' tüpünden ( $10^3$  cfu/ml) 100 µl, 'D' ve 'E' tüpünden ise 10'ar µl alınarak antibiyotik içermeyen (0 µg/ml) MHA besiyerlerine ekilmiştir. Plaklar 48 saat 35±2°C'de inkübe edildikten sonra bakteri kolonileri sayılmıştır.

Her bir test edilecek izolat için ana bakteri süspansiyonundan (A) ( $10^8$  cfu/ml) 100'er µl alınarak ertapenem ve meropenem içeren MHA besiyerlerine (0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 ve 256 µg/ml) ekilmiştir. Bu işlem tüm heterojen direnç düşünülen suşlar için yapılmıştır.

Plaklar 48 saat 35±2°C'de inkübe edildikten sonra farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren plaklarda üreme gösteren bakteri kolonileri sayılmış ve heterojen direnç popülasyon sıklığı hesaplanmıştır.

Heterojen direnç popülasyon sıklığı; üremenin görüldüğü en yüksek ilaç konsantrasyonuna sahip plaktaki koloni sayısı, ilaç içermeyen plaktaki koloni sayısına bölünerek hesaplanmıştır (109, 115, 117, 118).



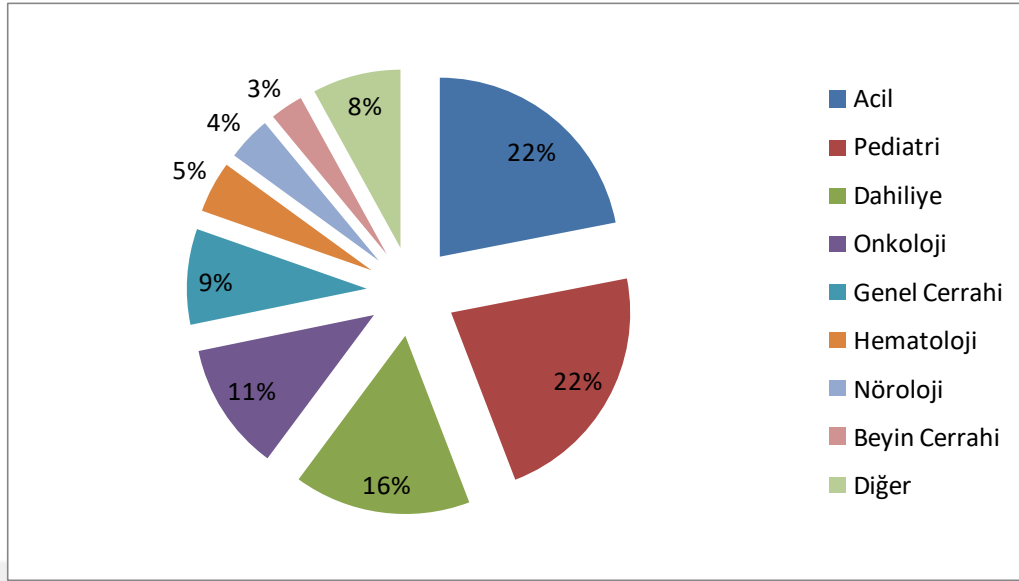
### 3.4. BULGULAR

Çalışmamıza Ocak 2016 - Ağustos 2018 tarihleri arasında olmak üzere 301 adet kan kültürü izolatı dahil edilmiştir. Bunların 196'sı (%65,1) *K.pneumoniae* ve 105'i (%34,8) ise *E.coli* izolatıdır. Aynı hastadan ikinci kez izole edilen suşlar çalışmaya dahil edilmemiştir.

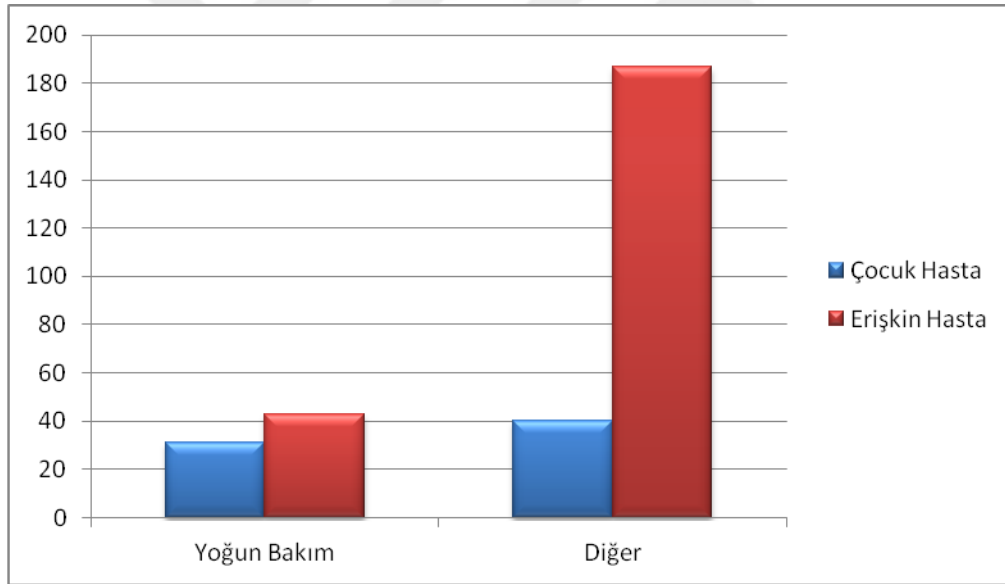
Çalışmamıza dahil edilen 301 izolatın 230'u (%76,4) erişkin hastalardan, 71'i ise (%23,6) çocuk hastalardan izole edilmiştir. Çalışmaya alınan suşların 167'si (%55) erkek, 134'ü (%45) ise kadın hastalardan izole edilmiştir.

İzolatların kliniklere göre dağılımına bakıldığında ise; örneklerin %22'sinin acil ve yine aynı oranda örneğin pediatri kliniğine ait olduğu gözlenmiştir. Örneklerin %85,8'inin dahili birimlerden, %14,2'sinin ise anestezi ve cerrahi birimlerden gönderildiği tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen izolatların klinik birimlere göre dağılımı Şekil 4.1'de görülmektedir.

İncelenen örneklerin yoğun bakım ve diğer birimlere göre dağılımına bakıldığında ise; 74 (%24,5) örneğin çeşitli yoğun bakım ünitelerinden gönderildiği ve bunların 43'ünün (%58,1) erişkin hastaya ait iken 31'inin (%41,9) çocuk hastaya ait olduğu belirlenmiştir. Yoğun bakım ve diğer bölümlere göre çocuk ve erişkin hasta dağılımı Şekil 4.2'de görülmektedir.



**Şekil 4.1.** Örneklerin kliniklere göre dağılımı



**Şekil 4.2.** Yoğun bakım ve diğer bölümlere göre çocuk/erişkin hasta dağılımı

Çalışılan izolatların Phoenix otomatize sistemiyle imipeneme 180'i (%60) duyarlı, 26'sı (%8,6) orta duyarlı, 95'i (%31,4) dirençli bulunmuştur. Ertapeneme, suşların 145'i (%48,2) duyarlı, 2'si (%0,6) orta duyarlı ve 154'ü (%51,2) dirençli bulunmuştur. Meropenem için ise suşların 193'ü (%64,2) duyarlı, 10'u (%3,3) orta duyarlı ve 98'i (%32,5) dirençli olarak tespit edilmiştir.

Disk difüzyon yöntemiyle ise imipenem için izolatların 192'si (%63,7) duyarlı, 75'i (%25) orta duyarlı, 34'ü (%11,3) dirençli bulunmuştur. Ertapenem izolatların 142'si (%47,1) duyarlı, 10'u (%3,3) orta duyarlı, 149'u (%49,6) dirençli bulunurken; meropenem 170'i (%56,4) duyarlı, 45'i (%15) orta duyarlı ve 86'sı (%28,6) dirençli bulunmuştur.

Gradient test yöntemiyle imipenem suşların 218'i (%72,4) duyarlı, 39'u (%13) orta duyarlı, 44'ü (%14,6) dirençli bulunurken, ertapenem için 155'i (%51,4) duyarlı, 20'si (%6,6) orta duyarlı ve 126'sı (%42) dirençli, meropenem için ise 208'i (%69,1) duyarlı, 22'si (%7,3) orta duyarlı ve 71'i (%23,6) dirençli şeklindedir.

Sensititre mikrodilüsyon yöntemiyle sadece meropenem duyarlılığına bakılabilmektedir. Bu yöntem ile meropenem izolatların 210'u (%69,8) duyarlı, 11'i (%3,6) orta duyarlı ve 80'i (%26,6) dirençli olarak bulunmuştur.

Farklı yöntemlerle elde edilen imipenem, ertapenem ve meropenem duyarlılık sonuçları sırasıyla Tablo 4.1, Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.1.** Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen imipenem duyarlılık sonuçları

<b>İmipenem</b>	<b>Phoenix</b>	<b>Disk Difüzyon</b>	<b>Gradient Test</b>
	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>	<b>n(%)</b>
<b>Duyarlı</b>	180(60)	192(63,7)	218(72,4)
<b>Orta Duyarlı</b>	26(8,6)	75(25)	39(13)
<b>Dirençli</b>	95(31,4)	34(11,3)	44(14,6)

**Tablo 4.2.** Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen ertapenem duyarlılık sonuçları

<b>Ertapenem</b>	<b>Phoenix</b>	<b>Disk Difüzyon</b>	<b>Gradient Test</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Duyarlı</b>	145(48,2)	142(47,1)	155(51,4)
<b>Orta Duyarlı</b>	2(0,6)	10(3,3)	20(6,6)
<b>Dirençli</b>	154(51,2)	149(49,6)	126(42)

**Tablo 4.3.** Phoenix, disk difüzyon ve gradient test ile elde edilen meropenem duyarlılık sonuçları

<b>Meropenem</b>	<b>Phoenix</b>	<b>Disk Difüzyon</b>	<b>Gradient Test</b>	<b>Sensititre Mikrodilüsyon</b>
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>
<b>Duyarlı</b>	193(64,2)	170(56,4)	208(69,1)	210(69,8)
<b>Orta Duyarlı</b>	10(3,3)	45(15)	22(7,3)	11(3,6)
<b>Dirençli</b>	98(32,5)	86(28,6)	71(23,6)	80(26,6)

Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçlar ile disk difüzyon ve gradient test yöntemleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması Tablo 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. Dirençli suşların duyarlı olarak saptanması “çok büyük hata”, duyarlı suşların dirençli olarak saptanması “büyük hata”, dirençli veya duyarlı suşların orta derece duyarlı, ya da orta derece duyarlı suşların dirençli veya duyarlı saptanması “küçük hata” olarak kabul edilmiştir.

**Tablo 4.4.** Ertapenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Ertapenem	Phoenix Otomatize Sistem			
	Uyum (%)	Çok Büyük Hata (%)	Büyük Hata (%)	Küçük Hata (%)
Disk Difüzyon	281 (93,4)	4 (1,3)	4 (1,3)	12 (4)
Gradient Test	265 (88)	1 (0,4)	13 (4,3)	22 (7,3)

**Tablo 4.5** İmipenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

İmipenem	Phoenix Otomatize Sistem			
	Uyum (%)	Çok Büyük Hata (%)	Büyük Hata (%)	Küçük Hata (%)
Disk Difüzyon	220 (73)	1 (0,4)	13 (4,3)	67 (22,3)
Gradient Test	227 (75,4)	1 (0,4)	22 (7,3)	51(16,9)

**Tablo 4.6.** Meropenem duyarlılığının saptanmasında Phoenix otomatize sistem ile elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Meropenem	Phoenix Otomatize Sistem			
	Uyum (%)	Çok Büyük Hata (%)	Büyük Hata (%)	Küçük Hata (%)
<b>Disk Difüzyon</b>	247 (82)	5 (1,7)	6 (2)	43 (14,3)
<b>Gradient Test</b>	258 (85,8)	2 (0,6)	15 (5)	26 (8,6)

Sensititre mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçların gradient test ve disk difüzyon yöntemi ile elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması ise Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** Meropenem duyarlılığının saptanmasında Sensititre mikrodilüsyon yöntemiyle elde edilen sonuçların disk difüzyon ve gradient test yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

Meropenem	Sensititre Mikrodilüsyon			
	Uyum (%)	Çok Büyük Hata(%)	Büyük Hata (%)	Küçük Hata (%)
<b>Disk Difüzyon</b>	249 (82,8)	6 (2)	2 (0,6)	44 (14,6)
<b>Gradient Test</b>	271 (90)	3 (1)	4 (1,3)	23 (7,7)

Çalışmaya dahil edilen 301 izolattan 160'ı (%53,1) en az bir yöntemle üç ilaçtan en az birine orta duyarlı ya da dirençli olarak bulunmuştur. Bu izolatların 144'ü (%90) *K.pneumoniae* ve 16'sı (%10) *E.coli* olarak belirlenmiştir.

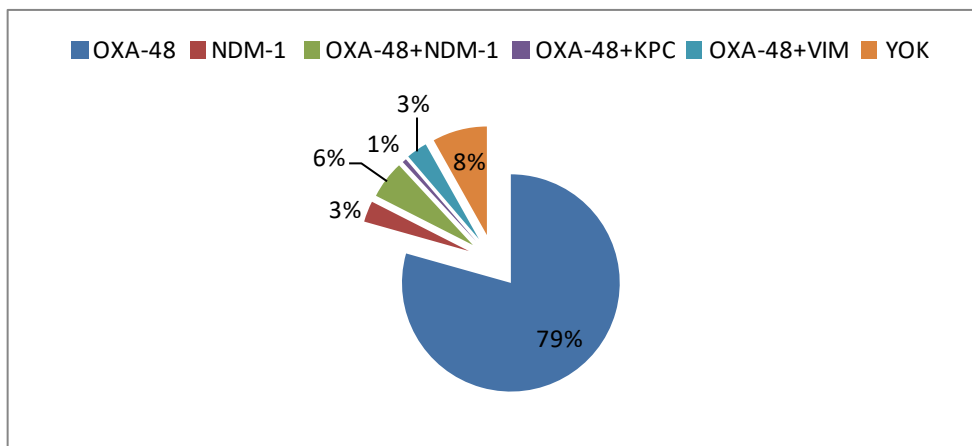
PZR yöntemi ile direnç genlerine bakıldığında izolatların 147'sinde en az bir direnç geni saptanırken 13'ünde bakılan beş genden herhangi biri tespit edilememiştir.

İzolatlarda en sık OXA-48 gen varlığı saptanmıştır. OXA-48, izolatların 127'sinde (%79) tek başına, 15 izolatta (%9,3) ise NDM-1, VIM veya KPC genleriyle birlikte gösterilmiştir. Buna göre izolatların %88'inde (142/160) OXA-48 geni saptanmıştır.

Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta NDM-1 geni saptanmıştır. NDM-1, beş izolatta tek başına, dokuz izolatta ise OXA-48 ile birlikte saptanmıştır. Toplam 14 izolatta NDM-1 varlığı gösterilmiştir.

VIM (n:5) ve KPC (n:1) genleri saptanan tüm izolatlarda OXA-48 geni de pozitif bulunmuştur. IMP geni ise hiçbir izolatta saptanmamıştır.

PZR yöntemiyle saptanan genlerin dağılımı Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.3.** PZR yöntemiyle saptanan karbapenemaz genlerinin dağılımı

Çalışmaya dahil edilen 301 izolatın PZR yöntemi ile 154'ünde (%51,1) bakılan karbapenem direnç genlerinden birine rastlanmaz iken 147'sinde (%48,9) bir veya birden fazla direnç geni tespit edilmiştir. PZR yöntemi ile elde edilen sonuçların antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçlar ile karşılaştırılması Tablo 4.8'de verilmiştir.

**Tablo 4.8.** PZR yöntemiyle elde edilen sonuçlar ile antibiyotik duyarlılık testleriyle elde edilen sonuçların karşılaştırılması

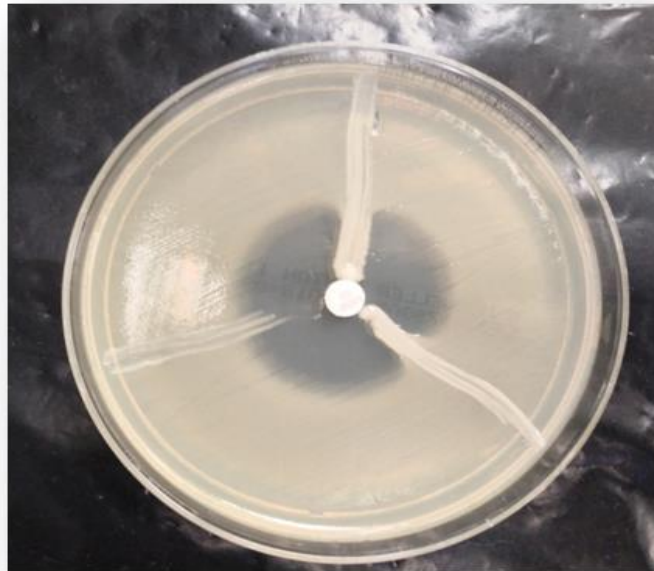
Yöntem		Gradient Test n(%)			Disk Difüzyon n(%)			Phoenix n(%)			Sensititre Mikrodilüsyon n(%)		
PZR		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Gen Yok n(%)	154	145 (%94,1)	4 (%2,6)	5 (%3,3)	138 (%89,6)	6 (%4)	10 (%6,4)	141 (%91,5)	2 (%1,3)	11 (%7,2)	149 (%96,7)	3 (%2)	2 (%1,3)
OXA-48 n(%)	127	10 (%7,8)	16 (%12,6)	101 (%79,6)	3 (%2,3)	4 (%3,2)	120 (%94,5)	3 (%2,3)	-	124 (%97,7)	57 (%45)	8 (%6)	62 (%49)
NDM-1 n(%)	5	-	-	5 (%100)	-	-	5 (%100)	-	-	5 (%100)	-	-	5 (%100)
OXA-48 +NDM-1 n(%)	9	1 (%11)	-	8 (%89)	1 (%11)	-	8 (%89)	-	-	9 (%100)	1 (%11)	-	8 (%89)
OXA-48 +KPC n(%)	1	-	-	1 (%100)	-	-	1 (%100)	-	-	1 (%100)	-	-	1 (%100)
OXA-48 +VIM n(%)	5	-	-	5 (%100)	-	-	5 (%100)	-	-	5 (%100)	2 (%40)	-	3 (%60)

OXA-48 pozitif olan 142 izolatın 127'si (%89,4) *K.pneumoniae* iken 15'i (%10,6) *E.coli* olarak belirlenmiştir. Hem *K.pneumoniae* hem de *E.coli* izolatlarında en sık saptanan karbapenemaz geni OXA-48'dir. Karbapenemaz varlığı saptanan *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında karbapenemaz tiplerinin dağılımı Tablo 4.9'da verilmiştir.

**Tablo 4.9.** Karbapenemaz varlığı saptanan *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında karbapenemaz tiplerinin dağılımı

Karbapenemaz geni	<i>K.pneumoniae</i> n(%)	<i>E.coli</i> n(%)	Toplam n(%)
OXA-48	114 (86,3)	13 (86,8)	127 (86,4)
NDM-1	5 (3,8)	-	5 (3,4)
OXA-48 + NDM-1	8 (6,1)	1 (6,6)	9 (6,1)
OXA-48 + VIM	5 (3,8)	-	5 (3,4)
OXA-48 + KPC	-	1 (6,6)	1 (0,7)
<b>Toplam</b>	<b>132</b>	<b>15</b>	<b>147</b>

Modifiye Hodge testi sonuçları değerlendirildiğinde PZR ile karbapenemaz geni pozitif bulunan 147 izolatın 137'sinde pozitif sonuç bulunmuştur (Şekil 4.4). Yalancı negatif sonuç elde edilen on izolatın hepsinde tek başına OXA-48 geni saptanmıştır. PZR ile negatif bulunan 9 izolat ise MHT ile pozitif olarak belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile MHT sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.10'da verilmiştir.

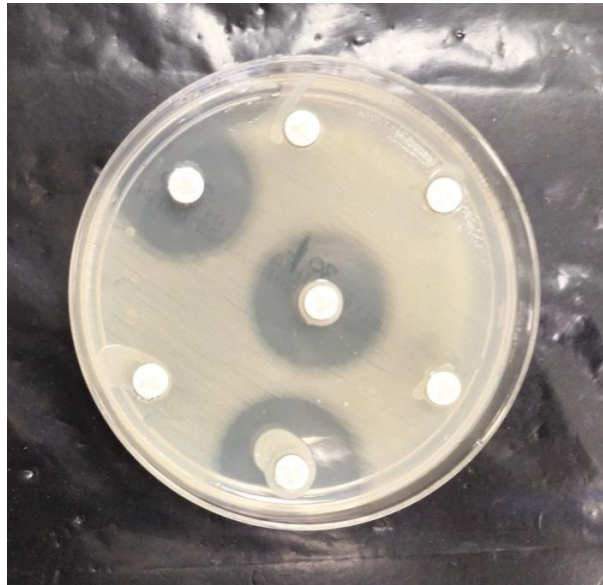


**Şekil 4.4.** MHT ile karbapenemaz varlığının gösterilmesi

**Tablo 4.10.** Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile Modifiye Hodge Testi (MHT) sonuçlarının karşılaştırılması

Yöntem		MHT		Toplam
		+	-	
Karbapenemaz geni	+	137	10	<b>147</b>
	-	9	145	<b>154</b>
<b>Toplam</b>		<b>146</b>	<b>155</b>	<b>301</b>

Karbapenemaz inaktivasyon metodu (CIM) sonuçları değerlendirildiğinde PZR ile karbapenemaz geni pozitif bulunan 147 izolatın 102 (%69.3)'sinde pozitif sonuç elde edilmiştir (Şekil 4.5). Yalancı negatif sonuç elde edilen 45 izolatın 41'inde (%91,1) PZR ile tek başına OXA-48, 4'ünde (%8,9) ise OXA-48+NDM-1 geni saptanmıştır. PZR ile negatif bulunan 4 izolat ise CIM testi ile pozitif olarak belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile CIM sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.11'de verilmiştir.



**Şekil 4.5.** CIM testi ile karbapenemaz varlığının gösterilmesi

**Tablo 4.11.** Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) sonuçlarının karşılaştırılması

Karbapenemaz geni	İzolat Sayısı	CIM Pozitif n(%)	CIM Negatif n(%)
<b>OXA-48</b>	127	86 (67,8)	41 (32,2)
<b>NDM-1</b>	5	5 (100)	-
<b>OXA-48 + NDM-1</b>	9	5 (55,6)	4 (44,4)
<b>OXA-48 + VIM</b>	5	5 (100)	-
<b>OXA-48 + KPC</b>	1	1 (100)	-
<b>Negatif</b>	154	4 (2,6)	150 (97,4)
<b>TOPLAM</b>	<b>301</b>	<b>102</b>	<b>45</b>

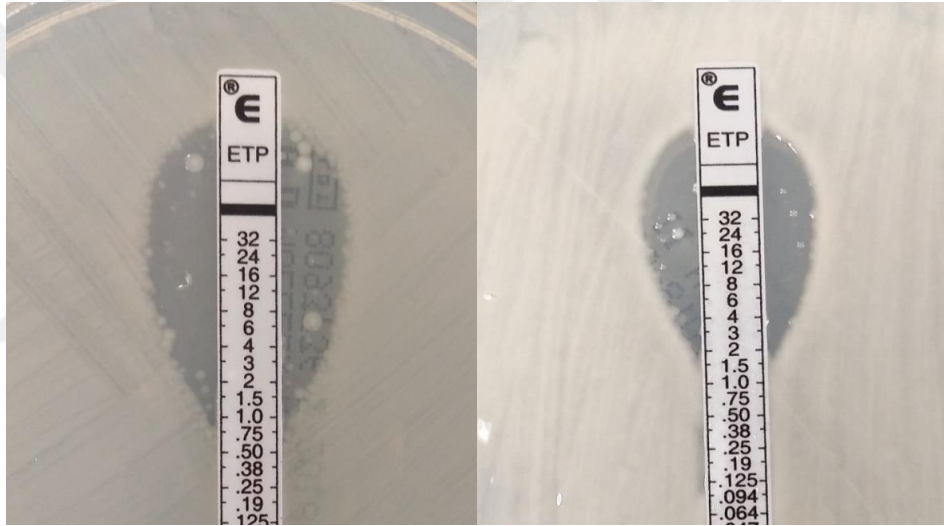
Karbapenemaz confirmasyon disk sonuçları değerlendirildiğinde fenotipik yöntemlerle karbapenem dirençli bulunan 160 izolatın 147'sinde (%91,8) karbapenemaz enzimi saptanmıştır. PZR yöntemiyle elde edilen sonuçlarla karbapenemaz confirmasyon disk sonuçları karşılaştırıldığında 108 izolatta uyum saptanmıştır. Bunlardan 102'si OXA-48, 2'si NDM-1, 3'ü OXA-48+NDM-1 ve 1'i OXA-48+VIM olarak belirlenmiştir. PZR ile karbapenemaz geni saptanan 10 izolatta confirmasyon diskiyle karbapenemaz enzimi tespit edilememiştir. Confirmasyon diski ile elde edilen sonuçlar ile PZR sonuçlarının karşılaştırılması Tablo 4.12'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.12.** Polimeraz zincir reaksiyonu sonuçları ile karbapenemaz confirmasyon disk sonuçlarının karşılaştırılması

		PZR				
		OXA-48	NDM-1	OXA-48 + NDM-1	OXA-48 + KPC	OXA-48 + VIM
Karbapenemaz Konfirmasyon Diski	OXA-48	102	-	4	-	4
	MBL	2	2	1	-	-
	KPC	-	-	-	1	-
	OXA-48 + MBL	14	3	3	-	1
	OXA-48 + KPC	-	-	-	-	-
	Yok	9	-	1	-	-
	TOPLAM	127	5	9	1	5

Günümüzde *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenem heterodirencinin saptanmasında kullanılan gerek yöntem gerekse o yönteme ait kriterler konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bu çalışmada Sun ve ark.larının (115) kullanmış olduğu kriterler kullanılarak karbapenem heterodirenci saptanmıştır. Buna göre disk difüzyon yöntemiyle ve/veya gradient test yöntemiyle disklerin etrafında oluşan zon içinde ya da gradient şerit elipsi içinde üreme gösteren her izolat **karbapenem-heterodirençli** olarak kabul edilmiştir. Birden fazla karbapeneme heterodirenç saptanması durumunda **ko-heterodirenç** tanımı kullanılmıştır (115). Karbapenem heterodirençli olarak kabul edilen tüm izolatlara PAP yöntemi uygulanmış ve heterodirenç sıklığı saptanmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 301 izolatın disk diffüzyon testi ve gradient test yöntemi sonuçları değerlendirilmiştir. Sun ve ark.larının kullandığı kriterlere göre zon içi ve/veya elips içi üreme saptanmış 21 (%6,9) izolat heterojen dirençli kabul edilmiştir (Şekil 4.6). Heterodirenç sıklığı en fazla ertapenemde (20/301; %6,6) gözlenmiştir. Bunu sırasıyla meropenem ( 16/301; %5,3) ve imipenem (13/301; %4,3) izlemiştir. Ko-heterodirenç açısından izolatlar değerlendirildiğinde ertapenem, imipenem ve meropenem heterodirenç birlikteliği 13 olguda saptanırken, ertapenem ve meropenem heterodirenç birlikteliği ise sadece iki olguda görülmüştür.



**Şekil 4.6.** Gradient testte inhibisyon elipsi içinde üreme gösteren *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatı

Heterodirenç saptanan 21 izolata hem ertapenem hem de meropenem kullanılarak heterodirençli alt popülasyon sıklığının tespit edilmesi amacıyla PAP yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada elde edilen PAP analiz sonuçları Tablo 4.13'de verilmiştir

**Tablo 4.13.** Heterojen dirençli izolatlar ve alt popülasyon sıklığı

İzolat No	Meropenem			Ertapenem			PZR
	Gradient Test	PAP'da saptanan en yüksek konsantrasyon	Frekans	Gradient Test	PAP'da saptanan en yüksek konsantrasyon	Frekans	
1	6	32	0,7x10 <sup>-5</sup>	>32	64	0,6x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
2	0,75	2	0,3x10 <sup>-5</sup>	0,38	4	2,8x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
3	0,75	32	4,0x10 <sup>-7</sup>	1	128	2,0x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
4	0,50	16	3,3x10 <sup>-7</sup>	0,50	64	0,8x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
5	0,0094	4	1,0x10 <sup>-7</sup>	0,125	16	0,5x10 <sup>-5</sup>	-
6	0,0094	2	2,0x10 <sup>-7</sup>	0,023	2	2,0x10 <sup>-7</sup>	-
7	0,75	32	6,0x10 <sup>-7</sup>	0,75	64	1,3x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
8	1	32	1,0x10 <sup>-7</sup>	3	256	0,5x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
9	0,38	4	0,8x10 <sup>-5</sup>	1,5	16	1,5x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
10	0,38	8	3,7x10 <sup>-7</sup>	1	64	0,6x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
11	0,38	32	4,1x10 <sup>-7</sup>	1	256	1,6x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
12	0,032	8	2,6x10 <sup>-7</sup>	0,016	64	0,6x10 <sup>-7</sup>	-
13	0,50	16	0,6x10 <sup>-7</sup>	1	32	0,6x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
14	0,19	1	1,0x10 <sup>-5</sup>	0,38	1	1,6x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
15	0,25	16	7,5x10 <sup>-7</sup>	0,38	256	3,3x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
16	1	32	1,0x10 <sup>-7</sup>	2	64	1,0x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
17	4	4	0,7x10 <sup>-5</sup>	1	8	6,1x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
18	8	256	0,8x10 <sup>-7</sup>	2	256	3,3x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
19	1,5	256	0,6x10 <sup>-5</sup>	1,5	256	2,0x10 <sup>-7</sup>	OXA-48
20	0,50	64	3,3x10 <sup>-6</sup>	1	256	0,6x10 <sup>-5</sup>	OXA-48
21	8	256	1,0x10 <sup>-5</sup>	3	256	1,0x10 <sup>-5</sup>	OXA-48

Heterodirençli izolatların 11'i (7 *K.pneumoniae*, 4 *E.coli*) erişkin hastadan, 10'u (9 *K.pneumoniae*, 1 *E.coli*) çocuk hastadan izole edilmiştir. Erişkin hastalarda %4,7(11/230) oranında, çocuk hastalarda ise %14 (10/71) oranında heterodirençli izolat saptanmıştır. Heterodirenç saptanan 21 izolatın 18 (%85,7) 'inde OXA-48 geni saptanmıştır. Diğer 3 izolat erişkin hastalara ait olup, PZR ile bakılan beş karbapenemaz geninden herhangi biri bulunmamıştır.



## 5.TARTIŞMA

*Enterobacteriaceae* üyeleri hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlarda karşımıza en sık çıkan etkenlerdendir. Gram negatif bakteriler hücre duvar yapılarında bulunanı dış membran nedeniyle birçok antibiyotiğe doğal dirençlidir. Çok ilaca dirençli mikroorganizmaların sayısının günden güne artması karbapenem grubu ilaçları tedavide önemli bir yere taşımıştır.

*Enterobacteriaceae* ailesi bakteriyemi ve hayatı tehdit eden çeşitli enfeksiyonlar açısından oldukça önemlidir. Bu tür enfeksiyonlarda karbapenemlerin sıkça kullanılması bu grup ilaçlara karşı direncin gelişmesine ve hızla artmasına neden olmaktadır. Karbapenem direnç oranlarının ve dirence yol açan karbapenemaz enzimlerinin ülkeden ülkeye, hatta merkezden merkeze değişiklik gösterdiği görülmektedir. Ancak direnç oranlarının giderek artmakta olması her merkez için kabul edilebilir bir gerçektir. Bu nedenle dirence yol açan enzimlerin ve direnç profillerinin belirlenmesi tedavi planı ve başarısı açısından büyük önem taşımaktadır.

Çalışmamıza dahil edilen 301 suşun 230'u (%76,4) erişkin hastalardan 71'i (%23,6) ise çocuk hastalardan izole edilmiştir. Erişkin hasta grubuna ait 230 kan izolatının 108'si (%46,9) karbapenem dirençli olarak saptanmıştır. Çocuk hastalarda ise 71 kan izolatından 52'sinde (%73,2) karbapenem direnci tespit edilmiştir.

Çok ilaca dirençli suşlarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde karbapenem kullanımının artması direnci de beraberinde getirmektedir. Yapılan çalışmalarda yıllar içerisinde karbapenemlere karşı direnç oranlarının giderek arttığı açıkça görülmektedir. 2004-2005 yılları arasında altı merkezin katılımıyla yapılan HİTİT sürveyans çalışmasında *E.coli* izolatlarında imipenem direnç saptanmazken *K.pneumoniae* izolatlarında imipenem direnç oranı %3,2 olarak bulunmuştur (119). Aral ve arkadaşlarının 2008-2011 yılları arasında 624 idrar izolatını dahil ettikleri çalışmada, *K.pneumoniae* izolatlarında imipenem direnci %12,5 ve ertapenem direnci %18,7 olarak bildirilmiş, *E.coli* izolatlarında ise imipenem direnci saptanmaz

iken ertapenem direnç oranı %0,3 olarak tespit edilmiştir (120). Özger ve ark. 2012 yılında yayınlanan çalışmalarında ise çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında %29,2 oranında ertapenem direnci bildirmişlerdir (121).

Bizim çalışmamızda ise *K.pneumoniae* izolatlarında %67,3 ve *E.coli* izolatlarında %14,2 oranında karbapenem direnci saptanmıştır. *K.pneumoniae* izolatlarında ertapenem, meropenem ve imipenem direnç oranları sırasıyla %66,3, %50 ve %30,1 olarak belirlenmiştir. *E.coli* izolatlarında ise meropenem ve imipenem direnci %5,7 ve ertapenem direnci %14,2 olarak tespit edilmiştir. Her üç ilaca karşı da yüksek oranda direnç görülmesinin, hastanemizde karbapenem grubu ilaçların ampirik olarak sıkça kullanılmasıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Günümüzde, otomatize sistemler ve çeşitli ticari ürünler mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde oldukça sık kullanılmaktadır. Hızlı sonuç elde edilmesi ve kolay uygulanabilir olmaları bu sistemlerin tercih edilmesindeki en önemli nedenler olarak görülmektedir. Yapılan çalışmalarda otomatize sistemlerin karbapenem duyarlılıklarını saptamadaki başarısı farklılık göstermektedir. 2006 yılında yapılan bir çalışmada sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile imipeneme orta duyarlı/dirençli bulunan 15 *K.pneumoniae* izolatından MicroScan otomatize sistemi ile 1 (%6,7), Phoenix ile 2 (%13,4), VITEK ile 10 (%67), VITEK 2 ile 5 (%33) ve Sensititre ile 13 (%87) izolat imipeneme duyarlı bulunmuştur (122). Yapılan başka bir çalışmada ise 39'u karbapenemaz üreten ve 16'sı karbapenemaz dışı mekanizmalarla karbapeneme dirençli olan 55 suş farklı otomatize sistemlerle incelenmiş ve karbapenem direncini belirlemedeki duyarlılık/özgürlük oranları Phoenix için %100/%0, MicroScan NM36 için %85/%6, MicroScan NBC39 için %82/%19 ve VITEK 2 için %74 / %38 olarak saptanmıştır (123).

Bizim çalışmamızda Phoenix otomatize sistem ve Sensititre mikrodilüsyon yönteminin diğer antibiyotik duyarlılık yöntemleriyle (disk

difüzyon yöntemi, gradient test yöntemi) karşılaştırılması sonucunda her üç karbapenem için de çok büyük hata, büyük hata ve küçük hata tespit edilmiştir. Uyum %75,4 - %93,4 arasında değişen oranlarda gözlemlenmiştir. En yüksek uyum ertapenemde saptanırken en düşük uyum oranı imipenemde görülmüştür. Bu durumun imipenemin diğer karbapenemlere göre etkinliğini daha çabuk kaybetmesi ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür.

Karbapenemaz üreten izolatlarının hızlı ve doğru olarak saptanması hem uygun tedavinin belirlenmesi hem de enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınabilmesi için büyük önem taşımaktadır. Günümüzde karbapenemazların saptanmasında MHT, CIM, Carpa NP ve karbapenemaz konfirmasyon diskleri olmak üzere farklı fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada karbapenemaz enzim varlığını saptamak amacıyla fenotipik yöntem olarak MHT, CIM ve karbapenemaz konfirmasyon diskleri kullanılmıştır.

Modifiye Hodge testi, rutin laboratuvarlarda karbapenemaz varlığının saptanması amacıyla yaygın olarak kullanılan fenotipik yöntemlerden biridir. Yapılan çalışmalarda bu yöntemin duyarlılığı ve özgüllüğü farklılık göstermektedir. Girlich ve ark., 54 karbapenemaz pozitif izolatta yaptıkları çalışmada MHT yönteminin Sınıf A ve D karbapenemazları saptamada yüksek duyarlılığa, MBL enzimlerini (sınıf B) saptamada ise düşük duyarlılığa sahip olduğunu bulmuşlardır (124). Kim ve ark. tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise MHT yönteminin MBL enzimlerinin sadece %60,6'sını saptayabildiği ancak testin duyarlılığının MBL enziminin tipiyle de yakından ilişkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada MHT yöntemi VIM tipi enzimleri saptamada NDM tipi enzimlere kıyasla daha başarılı bulunmuştur. Bunun yanısıra MacConkey agar kullanımının veya MHA besiyeri içerisine çinko ilave edilmesinin NDM enzimini saptamada duyarlılığı artırdığı belirtilmiştir (125).

Türkiye'den yapılan çalışmalara bakıldığında; Us ve ark. 2010-2014 yılları arasında 112 *Enterobacteriaceae* izolatıyla yaptıkları çalışmada karbapenemaz geni pozitif olan 94 izolatın 87'sini (%92,6) MHT ile pozitif

olarak saptarken; karbapenemaz geni negatif olan 18 izolatin 16'sında (%88,8) MHT ile yalancı pozitiflik bulmuşlardır. MHT ile yalancı negatif bulunan 7 izolattan 6'sında OXA-48, 1'inde ise OXA-48+VIM enzimi saptanmıştır (126). Perçin ve ark. 20 karbapenemaz pozitif (19 OXA-48, 1 IMP) *K.pneumoniae* izolatinın 19'unda MHT yöntemiyle pozitif sonuç elde ederken 13 karbapenemaz negatif *K.pneumoniae* izolatinın tümünde negatif sonuç elde etmişlerdir. Yalancı negatif saptanan izolatin OXA-48 pozitif olduğu belirtilmiştir (127).

Bizim çalışmamızda tüm izolatlara MHT yöntemi uygulanmış ve 146 izolat pozitif, 155 izolat ise negatif olarak saptanmıştır. Pozitif bulunan 146 izolatin 137'sinde (%93,8) karbapenemaz geni saptanırken 9'unda (%6,2) karbapenemaz geni saptanmamıştır. Ancak MHT ile pozitif bulunan PZR ile karbapenemaz geni saptanmamış 9 izolatta çalışmaya dahil edilmeyen diğer karbapenemaz enzimlerinin pozitif olabileceği unutulmamalıdır. MHT yöntemiyle negatif bulunan 155 izolatin ise 10'unda (%6,5) karbapenemaz geni saptanırken 145'inde (%93,5) karbapenemaz geni saptanmamıştır. MHT yöntemiyle yalancı negatiflik elde edilen izolatların hepsinde OXA-48 geni saptanmıştır. Çalışmamızda OXA-48 pozitif izolatlar için duyarlılık %93 diğer karbapenemaz enzimleri (NDM-1, VIM, KPC) için ise %100 bulunmuştur. Diğer çalışmalardan farklı olarak MBL grubu enzimleri saptamadaki duyarlılığın bu kadar yüksek olmasının nedeni çalışmaya dahil edilen MBL pozitif izolatların sayılarının OXA-48 üreten izolatlara göre oldukça düşük olması ve MBL pozitif bulunan izolatların çoğunun aynı zamanda OXA-48 pozitifliğine de sahip olması ile açıklanabilir. Çalışmamızda MHT yönteminin %5,8 oranında yalancı pozitiflik ve %6,8 oranında yalancı negatiflik gösterdiği saptanmıştır. Buna rağmen OXA-48 üreticilerini saptamadaki duyarlılığının yüksek olması ülkemiz gibi OXA-48 açısından endemik olan bölgelerde bu testin tarama amacıyla kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM), karbapenemaz varlığının saptanmasında kullanılan kolay ve hızlı uygulanabilen fenotipik bir yöntemdir. Bu yöntemle karbapenemaz enziminin tipi saptanmamakla birlikte rutin

mikrobiyoloji laboratuvarlarında tarama amacıyla kullanılabileceği önerilmektedir. Zwaluw ve ark.ları 2015 yılında yaptıkları çalışmada karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının %100'ünü CIM testi ile pozitif saptamışlardır. Aynı yöntemle nonfermentatif izolatlarda %98,8 oranında pozitiflik bulmuşlardır (128). CIM ve Carba NP testlerinin karşılaştırıldığı ve 256 *Enterobacteriaceae* izolatının (93 karbapenem dirençli) dahil edildiği bir çalışmada her iki testin duyarlılığı da %92,1 olarak saptanmıştır. Bu çalışmada CIM testi ile 3 tane NDM-1 pozitif izolatın ve 1 tane VIM-1 pozitif izolatın saptanamadığı vurgulanmıştır (129). Tijet ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada ise CIM testinin duyarlılığı %98,8 olarak belirtilmiştir (130).

Türkiye'den yapılan çalışmalarda da CIM yöntemi karbapenemaz enzim varlığını araştırmak amacıyla kullanılmış ve farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bayraktar ve ark. 2011-2017 yıllarına ait 109 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatı ve 1 pozitif ,15 negatif kontrol olmak üzere toplam 125 izolat dahil ettikleri çalışmada CIM testinin duyarlılığını %92,7 ve özgüllüğünü %100 olarak saptamışlardır (131). Tekintaş ve ark. nın karbapenemaz enzimi pozitif (33 OXA-48, 19 OXA-48 +NDM, 2 NDM) 54 *K.pneumoniae* izolatını dahil ettikleri çalışmalarında sadece 25 izolat (%46.2) CIM testi ile pozitif saptanmıştır. CIM testi ile 26 OXA-48 (%79), 2 OXA-48+NDM (%11) ve 1 NDM pozitif izolat saptanamamıştır (132).

Bizim çalışmamızda tüm izolatlara CIM testi uygulanmıştır. CIM testi ile pozitif bulunan 106 izolatın 102'sinde (%96,2) karbapenemaz geni saptanırken 4'ünde (%3,8) karbapenemaz geni saptanmamıştır. CIM testi ile negatif bulunan 195 izolatın ise 45'inde (%23,1) karbapenemaz geni saptanmıştır. Buna göre testin duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %69,3 ve %97,4 olarak saptanmıştır. Yanlış negatif sonuç elde edilen 45 izolat incelendiğinde bunların 41'inin OXA-48 ve 4'ünün OXA-48 + NDM-1 üreticisi olduğu belirlenmiştir. Bu veriler doğrultusunda imkanları kısıtlı laboratuvarlarda CIM testinin karbapenemaz varlığını hızlı tespit için

kullanılabileceği ancak negatif sonuçların doğrulanması gerektiği düşünülmektedir.

Günümüzde karbapenemaz enzimlerinin saptanması amacıyla farklı firmalar tarafından karbapenemaz confirmasyon diskleri üretilmiştir. Uygulanabilirliğinin daha kolay ve ucuz olması nedeniyle karbapenemaz enzimlerini saptamak amacıyla kullanılan diğer fenotipik yöntemler arasında yerini almasına neden olmuştur. Bu amaçla çalışmalarda en sık kullanılan Rosco ve MAST confirmasyon diskleridir. Yapılan farklı çalışmalarda elde edilen duyarlılık ve özgüllük oranları birbirinden oldukça farklılık göstermektedir.

Bartolini ve ark. karbapeneme duyarlı olmayan 108 *Enterobacteriaceae* izolatını dahil ettikleri çalışmalarında karbapenemaz varlığı, MHT, MBL gradient test, AmpC gradient test, EDTA ile çift disk testi, Rosco Diagnostica KPC ve MBL confirmasyon kiti ile kloksasillin inhibisyon testi olmak üzere farklı fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır ve %95 duyarlılık ve %99 özgüllük ile Rosco confirmasyon diskleri en başarılı yöntem olarak bulunmuştur (133). Peter ve ark.larının çalışmasında ise hem Rosco hem de MAST confirmasyon kitlerinin duyarlılığı ve özgüllüğü düşük saptanmıştır. Rosco confirmasyon kitinin duyarlılığı ve özgüllüğü sırasıyla %31,1 ve %69,3 bulunurken MAST confirmasyon kitinin duyarlılığı %28,8, özgüllüğü ise %79,6 olarak bildirilmiştir (134). Ambretti ve ark. nın çalışmasında ise 108 *Enterobacteriaceae* izolatı incelenmiş, Rosco confirmasyon diskinin duyarlılığı %100, özgüllüğü ise %98 olarak belirtilmiştir. Ayrıca bu disklerin MBL ve KPC enzimlerini belirlemede MHT yönteminden daha üstün olduğu vurgulanmıştır (135). MAST ve Rosco confirmasyon disklerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada ise 114 karbapenemaz (49 KPC, 27 NDM, 19 VIM, 14 OXA-48 benzeri, 5 IMP) pozitif, 28 karbapenemaz negatif *Enterobacteriaceae* izolatı değerlendirilmiş ve duyarlılık ve özgüllük oranları MAST diskleri için %78;%93, Rosco için ise %80;%93 olarak saptanmıştır. (136).

Karbapenemaz konfirmasyon diskleri Türkiye'den yapılan çalışmalarda da kullanılmıştır. Çakar ve ark.larının yaptıkları çalışmada karbapenemaz enzimi saptanan toplam 143 *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatında Rosco konfirmasyon kitiyle elde edilen sonuçlar ile PZR sonuçları arasında %100 uyum saptanmıştır (137). Tekintaş ve ark.nın yaptığı çalışmada ise Mast konfirmasyon diski kullanılmış ve PZR ile karbapenemaz geni saptanan 54 izolatın hepsinde uyumlu sonuç elde etmişlerdir (132).

Çalışmamızda 147 karbapenemaz geni pozitif izolata Rosco konfirmasyon diski uygulanmış ve 137'sinde (%93,2) karbapenemaz enzim tiplendirmesi yapılmıştır. Tiplendirme yapılamayan 10 izolatın (%6,8) 9'unun OXA-48 ve 1'inin OXA-48 + NDM-1 pozitif olduğu saptanmıştır. Rosco konfirmasyon diskinin OXA-48 geni pozitif izolatları %91,3 oranında saptadığı görülmüştür.

OXA-48 ilk olarak Türkiye'den izole edilmiş bir *K.pneumoniae* suşunda gösterilmiş ve daha sonraki yıllarda artan sıklıkta bildirimler yapılmıştır (76). Carrer ve arkadaşları 2008 yılında İstanbul'da bir üniversite hastanesinde OXA-48 üreten *K.pneumoniae* kaynaklı bir salgını bildirmişlerdir (77). Ülkemiz OXA-48 endemik bir ülke olarak kabul edilmektedir. Biçmen ve ark. 2012 yılında yaptıkları çalışmada karbapenem dirençli 197 *Enterobacteriaceae* izolatının moleküler yöntemlerle direnç mekanizmalarını araştırmış ve izolatların %93,4'ünde OXA-48 pozitifliği saptamışlardır (138). Alp ve ark. 2010-2011 arasında karbapenem dirençli 94 *K.pneumoniae* izolatının %91,5'inde OXA-48 , %1'inde NDM-1 ve %3,2'sinde OXA-48 + NDM-1 pozitifliği saptamışlardır (139). Çakar ve ark.nın 2013-2014 yılları arasında yaptıkları çok merkezli bir çalışmada %84,6 OXA-48, %6,3 NDM-1, %2,8 VIM, %1,4 IMP, %2,1 OXA-48+NDM-1, %2,1 OXA-48+VIM ve %0,7 VIM+NDM pozitifliği saptanırken hiçbir izolatta KPC pozitifliği tespit edilmemiştir (137). Ocak-Nisan 2013 tarihleri arasında İstanbul'da bir üniversite hastanesinde karbapenem dirençli 22 *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenemaz genleri araştırılmış ve izolatların 12'sinde NDM-1, 8'inde OXA-48 ve 2'sinde ise KPC-2 saptanmıştır (140).

Türkiye'den yapılan diğer çalışmalara benzer olarak bizim çalışmamızda da %86,3 OXA-48, %3,4 NDM-1, %6,1 OXA-48+NDM-1, %3,4 OXA-48+VIM ve %0,7 OXA-48+KPC pozitifliği saptanmıştır. Hiçbir izolatta ise IMP pozitifliğine rastlanmamıştır.

Heterojen direnç kavramı, bir bakteri popülasyonunda bulunan subgrupların belirli bir antibiyotiğe karşı farklı duyarlılık sergilediği bir fenomeni tanımlamaktadır. Ne yazık ki heterojen direnci belirlemede kullanılacak standart yöntemlerin eksikliği bu terimin uygunsuz kullanılmasına yol açmaktadır (99). Aynı izolatın hem dirençli hem de duyarlı alt popülasyonları aynı anda bulundurması olarak değerlendirildiğinde heterojen direnç tedavi başarısızlığı açısından önemli bir risk olarak görülmektedir (141).

Heterojen direnç birçok farklı bakteri grubunda saptanmakla birlikte *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenem heterodirenci yeni bir kavram olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde ne yazık ki *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem heterodirencinin araştırıldığı sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Dolayısıyla *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde karbapenem heterodirencinin saptanmasında kullanılan gerek metot gerekse o metota ait kriterler konusunda bir fikir birliği bulunmamaktadır.

Karbapenem heterodirenci konusunda yapılan çalışmalarda üç farklı yaklaşım öne çıkmaktadır. Bunlardan birincisi Sun ve ark.larının kullandığı algoritmadır. Bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle ve gradient test yöntemiyle disklerin etrafında oluşan zon içinde ya da gradient şerit elipsi içinde üreme gösteren her izolat karbapenem-heterodirençli olarak kabul edilmiştir. Tüm izolatlara PAP yöntemi uygulanmış ve heterodirenç sıklığı saptanmıştır. Buna göre bizim çalışmamızdaki 21 izolatın tümünü heterojen dirençli kabul edersek heterojen direnç oranı %6,9 olarak saptanmaktadır.

Heterodirenç saptanmasında kullanılan bir başka kriter El-Halfawy ve ark.ları tarafından tanımlanmıştır. Bu tanıma göre PAP yapıldığında en

yüksek inhibisyon etkisinin görüldüğü antibiyotik konsantrasyonu, hiç inhibisyon görülmeyen antibiyotik konsantrasyonundan en az 8 kat yüksek ise bu izolat heterojen dirençli olarak kabul edilmiştir (99). Buna göre bizim çalışmamızdaki zon içi üreme saptanan 21 izolattan meropenem-PAP bulgularına göre 21 (%6,9) 'i, ertapenem-PAP bulgularına göre ise 19'u (%6,3) heterojen dirençli olarak belirlenmiştir.

Heterodirenç saptanmasında kullanılan bir diğer kriter ise da Silva ve ark. (142) ile Lopez-Camacho ve ark.larının (116) yaptıkları çalışmalarda yer almaktadır. Bu iki çalışmada karbapenem MİK değeri ile PAP yönteminde, üremenin saptandığı en yüksek ilaç konsantrasyonu arasında 4 kat ve üzerinde artış saptanması durumunda heterojen direnç olarak kabul edilmiştir. Bu kriter kullanıldığında 21 izolatin hem meropenem-PAP bulgularına hem de ertapenem-PAP bulgularına göre 19'u (%6,3) heterojen dirençli olarak belirlenmiştir. Her iki PAP sonuçları birarada değerlendirildiğinde 21 izolatin hepsi heterodirençli olarak saptanmaktadır.

Karbapenem heterodirenci konusunda yapılan çalışmalarda bu fenomenin karbapenemaz genlerinin kazanılması ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda heterodirenç saptanan 21 izolatin 18'inde (%85,7) OXA-48 geni saptanmıştır. Diğer 3 izolat erişkin hastalara ait olup, PZR ile bakılan beş karbapenemaz geninden herhangi biri bulunmamıştır. Yapılan diğer çalışmalarda ise heterodirenç gösteren *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde VIM-1, KPC, OXA-48, NDM-1 olmak üzere farklı karbapenemaz enzimleri bildirilmiştir. OXA-48 pozitifliği sadece Lopez-Camacho ve ark.larının çalışmasında gösterilmiş olup *K.pneumoniae* izolatlarında saptanmıştır. Bizim çalışmamız OXA-48 pozitif *K.pneumoniae* izolatlarında yapılmış ikinci çalışmadır. OXA-48 pozitif *E.coli* izolatlarında ise karbapenem heterodirencinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Karbapenem heterodirenci gösteren ancak karbapenemaz geni saptanmamış izolatlar da bulunmaktadır. Da Silva ve ark.larının çalışmasında 2 heterodirençli *Enterobacter cloacae* izolatında PZR yöntemiyle karbapenemaz geni gösterilememiştir (142). İkonomidis ve ark.larının

karbapenem heterodirençli *A.baumannii* izolatlarında yaptıkları çalışmada da benzer şekilde karbapenemaz geni saptanmamıştır (101). Bizim çalışmamızda da karbapenem heterodirenci gösteren üç izolatta karbapenemaz geni saptanmamıştır. Karbapenemaz geni negatif bulunan heterodirençli 3 izolatta çalışmaya dahil edilmemiş olan diğer karbapenemaz enzimlerinin olma olasılığı da bulunmaktadır.

Günümüzde heterojen direnç konusu ile ilgili sınırlı sayıda makale olmasının yanısıra çalışmalara dahil edilen izolat sayıları oldukça az sayıdadır. Çalışmamız bu yönüyle literatüre önemli bir katkıda bulunmuştur. Bizim çalışmamıza benzer şekilde yüksek sayıda izolatin dahil edildiği bir başka çalışma Sun ve ark.larına aittir. Bu çalışmada 2011-2013 yılları arasında izole edilen 332 *E.coli* izolatı incelenmiş, imipenem, ertapenem ve meropenem için sırasıyla %25, %17,2 ve %3,9 olmak üzere yüksek oranda heterodirenç tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak karbapenemaz gen varlığı moleküler yöntemlerle araştırılmamıştır (115).

*Enterobacteriaceae* ailesi içinde heterojen karbapenem direncinin saptanması özellikle tedavi başarısı açısından çok önemlidir. Konvensiyonel yöntemlerle karbapenem duyarlı bulunmuş ancak heterodirenç saptanmış izolatlarla meydana gelen enfeksiyonların tedavisi sorun yaratmaktadır. Dolayısıyla günümüzde bu izolatların klinik açıdan değerinin ortaya konulması giderek daha büyük önem kazanmaktadır.

Karbapenem grubu ilaçlara karşı görülen heterojen direncin gerçek klinik etkisinin ve karbapenem duyarlı izolatlarda yer alan dirençli altpopüsyonların ilaç etkisi altındayken tam dirençli hale dönüşme olasılığının belirlenmesi amacıyla daha çok sayıda izolatların dahil edildiği çalışmalara büyük ihtiyaç bulunmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2011; 17(10): 1791-8.
2. Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 411-2.
3. Murray PR. Antibakteriyel Ajanlar, s:1077-1103, Başustaoğlu A (ed), Klinik Mikrobiyoloji. 2009, 9.baskı. Nobel Tıp Kitabevi, Ankara.
4. Mülazımoğlu L. 19862dan günümüze karbapenemler. Ankem Derg 2010; 24(Ek 2): 33-5.
5. Bulut A. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnci ve dirençten sorumlu enzimlerin varlığının araştırılması. Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, 2014, Afyon.
6. Aydın E. *Enterobacteriaceae* klinik izolatlarında karbapenemaz varlığının fenotipik yöntemlerle araştırılması. Osman Gazi Üniversitesi Tıpta Uzmanlık Tezi, 2013, Eskişehir.
7. Sarı H. Karbapenemlere dirençli gram negatif basil izolatlarında imipenem-edta / meropenem-edta disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta-laktamaz (mbl) varlığının araştırılması. Kartal Dr.Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, 2005, İstanbul.
8. Hancock REW. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Disease 1989; 27(Suppl 1): 93-9.
9. Lee EH, Nicolas MH, Kitzis MD, Pialoux G, Collatz E, Gutmann L. Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35(6): 1093-8.

10. Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumonia* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 563-9.
11. Farra A, Islam S, Stralfors A, Sörberg M, Wretling B. Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(5): 427-33.
12. Webber MA, Piddock LJV. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51(1): 9-11.
13. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi* 1996; 2: 80-6.
14. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1980; 289 (1036): 321-31.
15. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 969–76.
16. Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg* 2016; 30(2): 62-75.
17. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-58.
18. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5): 432-8.
19. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(2): 223-32.

20. Amyes SGB. Carbapenemases. *Ankem Derg* 1997; 11(2): 221-5.
21. Livermore, Dm. Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3(5): 489-95.
22. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4): 557-84.
23. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6): 1211-33.
24. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(6): 321-33.
25. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3): 470-82.
26. Güran M. Karbapenemaz enzimleri: Türkiye'deki durum üzerine bir derleme. *Turkiye Klinikleri J Med* 2016; 36(2): 98-105.
27. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros A. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40(9): 2080-6.
28. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(2): 260-4.
29. Naas T, Vandael L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(6): 1262-70.
30. Bush K, Pannell M, Lock JL, Queenan AM, Jorgensen JH, Lee RM, Lewis JS, Jarrett D. Detection systems for carbapenemase gene identification

- should include the SME serine carbapenemase. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(1): 1-4.
31. Carrer A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31(2): 181-2.
32. Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(10): 3485-7.
33. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(8): 999-1002.
34. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* 2012; 18(5): 263-72.
35. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(3): 561-5.
36. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol* 2013; 4: 48.
37. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4): 1151-61.
38. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York

- City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med 2005; 165(12): 1430-5.
- 39.Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. Int J Antimicrob Agents 2007; 30(6): 525-9.
- 40.Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H, Vrouhos G, Liakou V, Vatopouloset AC. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). J Infect 2009; 58(3): 213-9.
- 41.Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA ve arkadaşları. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. Lancet Infect Dis 2013; 13(9): 785-96.
- 42.Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces beta-lactamase bla<sub>KPC-2</sub> gene<sup>1</sup>. Emerg Infect Dis 2010; 16(9): 1349-56.
- 43.Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. 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.
- 44.Albayrak GT. Hastane infeksiyonu etkeni olan *Pseudomonas aeruginosa* kökenlerinde çift disk sinerji testi ve kombine çift disk sinerji ile metallo-betalaktamaz varlığının araştırılması. Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Tıpta Uzmanlık Tezi, 2008, İstanbul.
- 45.Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm. Clin Microbiol Rev 2005; 18(2): 306-25.

46. Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular beta-lactamases from *Bacillus cereus* 569/H. *Biochem J* 1967; 103(3): 27c-30c.
47. Iaconis JP, Sanders CC. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34(1): 44-51.
48. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22(4): 564-70.
49. Zhao WH, Hu ZQ. IMP-type metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol* 2011; 37(3): 214-26.
50. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, Quinn JP. First nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3538-40.
51. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene bla<sub>IMP</sub> among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(4): 824-9.
52. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother* 1991; 35(1): 147-151.
53. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4): 699-702.
54. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmitd FJ, Walsh TR. Molecular characterization of beta-lactamase gene, bla<sub>GIM-1</sub>, encoding a

- new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12): 4654-61.
55. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The New beta-lactamases. *N Engl J Med* 2005; 352(4): 380-91.
56. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* 2003; 41(12): 5407-13.
57. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of bla<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1584-90.
58. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT. Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(8): 2224-8.
59. Yong D, Choi YS, Roh KH, Kim CK, Park YH, Yum JH, Lee K, Chong Y. Increasing prevalence and diversity of metallo-beta-lactamases in *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., and *Enterobacteriaceae* from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(5): 1884-6.
60. Ktari S, Arlet G, Mnif B, Gautier V, Mahjoubi F, Ben Jmeaa M, Bouaziz M, Hammami A. Emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing VIM-4 metallo-beta-lactamase, CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase, and CMY-4 AmpC beta-lactamase in a Tunisian university hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(12): 4198-201.
61. Marcano D, Pasterán F, Rapoport M, Faccone D, Ugarte C, Salgado N, Payares D, Spadola E, López Y, Maggi G, Galas M, Sánchez D. First isolation

- of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. J Infect Dev Ctries 2008;2(3):241-4.
- 62.Giakkoupi P, Pappa O, Polemis M, Vatopoulos AC, Miriagou V, Zioga A, Papagiannitsis CC, Tzouveleki LS. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(9): 4048-50.
- 63.Tato M, Morosini M, García L, Alberti S, Coque MT, Canton R. Carbapenem heteroresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates belonging to the same clone: consequences for routine susceptibility testing. J Clin Microbiol 2010; 48(11): 4089-93.
- 64.Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Wash TR. Characterization of a new metallo-beta-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(12): 5046-54.
- 65.Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt FA, Balakrishnan R ve arkadaşları. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. Lancet Infect Dis 2010; 10(9): 597-602.
- 66.Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D, Rolain JM. New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: An ereview using google maps. Euro Surveill 2014; 19(20).
- 67.Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother 2011; 66(4): 689-92.
- 68.Albur MS, Noel A, Bowker K, MacGowan A. The combination of colistin and fosfomicin is synergistic against NDM-1-producing

- Enterobacteriaceae* in in vitro pharmacokinetic/ pharmacodynamic model experiments. Int J Antimicrob Agents 2015; 46(5): 560-7.
- 69.Koo VSW, O' Neill P, Elves A. Multidrug-resistant NDM-1 *Klebsiella* outbreak and infection control in endoscopic urology. BJU Int 2012; 110(11 Pt C): E922-6.
- 70.Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect Dis. 2011; 11(5): 355-62.
- 71.Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev. 2012; 25(4): 682-707.
- 72.Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source, J Antimicrob Chemother 1995; 36(3): 585-6.
- 73.Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(1): 196-9.
- 74.Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48- producing *Klebsiella pneumoniae* clone. Clin Microbiol Infect 2011; 17(12): E24-6.
- 75.Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. J Antimicrob Chemother 2006; 57(3): 373-83.
- 76.Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 15-22.

77. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(8): 2950–4.
78. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Maskari Z, Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class d beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(10): 4896-9.
79. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian Hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(3): 1274-8.
80. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(5): 2420-3.
81. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, Sifria CD. First Clinical Cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the “Menace” arrives in the new world. *J Clin Microbiol* 2013; 51(2): 680-3.
82. Skalova A, Chudejova K, Rotova V, Medvecký M, Studentova V, Chudackova E, Lavicka P, Bergerova T, Jakubu V, Zemlickova H, Papagiannitsis CC, Hrabaka J. Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic and evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. *Antimicrob Agents Chemother* 2017; 61(2).
83. Toraman ZA, Yakupogullari Y. Carbapenemase- producing *Pseudomonas aeruginosa* and ciprofloxacin use in neonatal intensive care units. *J Hosp Infect* 2003; 54(2): 164-5.

84. Aşçı Toraman Z, Yakupoğulları Y, Kizirgil A. Investigation of metallo beta-lactamases in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains. Turkish J Infect 2005; 19(1): 101-5.
85. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. J Antimicrob Chemother 2004; 54(1): 282-3.
86. Gacar GG, Midilli K, Kolaylı F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, Karadenizli A, Vahaboglu H. Genetic and enzymatic properties of metallo beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49(10): 4400-3.
87. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. Clin Microbiol Infect 2006; 12(7): 695-9.
88. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). Microb Drug Resist 2006; 12(4): 223-30.
89. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. Pak J Pharm Sci 2015; 28(3 Suppl): 1127-33.
90. Iraz M, Özad Düzgün A, Sandallı C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A ve arkadaşları. Distribution of beta-lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. Ann Lab Med 2015; 35(6): 595-601.
91. 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.

92. Bogaerts P, Naas T, Garch FE, Cuzon G, Deplano A, Delaire T, Huang TD, Lissou B, Nordmann P, Glupczynski Y. GES extended-spectrum beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(11): 4872-8.
93. Zeka AN, Poirel L, Sipahi OR, Bonnin RA, Arda B, Ozinel M, Ulusoy S, Bor C, Nordmann P. GES-type and OXA-23 carbapenemase producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(4): 1145-6.
94. Cicek AC, Saral A, Iraz M, Ceylan A, Duzgun AO, Peleg AY, Sandalli C. OXA and GES-type beta-lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(5): 410-5.
95. Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC. Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41(2): 161-6.
96. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48- encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1369-73.
97. Falagas ME, Makris GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(2): 101-4.
98. Georgios M. Heteroresistance. [www.intechopen.com](http://www.intechopen.com).
99. El-Halfawy OM, Valvano MA. Antimicrobial heteroresistance: an emerging field in need of clarity. *Clin Microbiol Rev* 2015; 28(1): 191-207.
100. Nunes A, Teixeira LM, Pontes Iorio NL, Reis Bastos CC, Fonseca LS, Souto-Pradon T, Netto dos Santos KR. Heterogeneous resistance to vancomycin in *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*

- and *Staphylococcus warneri* clinical strains: characterisation of glycopeptide susceptibility profiles and cell wall thickening. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 27(4): 307–15.
101. Ikonomidis A, Neou E, Gogou V, Vrioni G, Tsakris A, Pournaras S. Heteroresistance to meropenem in carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(12): 4055-9.
102. Rinder H, Mieskes KT, Loscher T. Heteroresistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis* 2001; 5(4): 339–45.
103. Morand B, Muhlemann K. Heteroresistance to penicillin in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104(35): 14098–103.
104. Alam M, Donabedian S, Brown W, Gordon J, Chow JW, Zervos MJ, Hersheberger E. Heteroresistance to vancomycin in *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 2001; 39(9): 3379–81.
105. Yamazumi T, Pfaller MA, Messer SA, Houston AK, Boyken L, Hollis RJ, Furuta I, Jones RN. Characterization of heteroresistance to fluconazole among clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 267–72.
106. Charles PG, Ward PB, Johnson PD, Howden BP, Grayson ML. Clinical features associated with bacteremia due to heterogeneous vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 2004; 38(3): 448–51.
107. Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(7): 3949–53.
108. Pournaras S, Ikonomidis A, Markogiannakis A, Maniatis AN, Tsakris A. Heteroresistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 2005; 55(6): 1055-6.

109. Pournaras S, Kristo I, Vrioni G, Ikonomidis A, Poulou A, Petropoulou D, Tsakris A. Characteristics of meropenem heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing clinical isolates of *K.pneumoniae*. J Clin Microbiol 2010; 48(7): 2601-4.
110. Zavascki AP, Falci DR, da Silva RC et al. Heteroresistance to carbapenems in new delhi metallo-beta-lactamase-1-producing isolates: a challenge for detection. Infect Control Hosp Epidemiol 2014; 35(6): 751-2.
111. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_8.1\\_Breakpoint\\_Tables](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_8.1_Breakpoint_Tables).
112. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 20<sup>th</sup> Informational Supplement, Document M100-S20, 2017. CLSI Wayne, PA.
113. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 2012; 67(4): 906-9.
114. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 2007; 59(2): 321-2.
115. Sun JD, Huang SF, Yang SS, Pu SL, Zhang CM, Zhang LP. Impact of carbapenem heteroresistance among clinical isolates of invasive *Escherichia coli* in Chongqing, southwestern China. Clin Microbiol Infect 2015; 21(5): 469.
116. López-Camacho E, Paño-Pardo JR, Sotillo A, Elías-López C, Martínez-Martínez L, Gómez-Gil R, Mingorance J. Meropenem heteroresistance in clinical isolates of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*. Diagn Microbiol Infect Dis 2018; 20.
117. Adams-Sapper S, Nolen S, Donzelli GF, Lal M, Chen K, Justo da Silva LH, Moreira BM, Riley LW. Rapid induction of high-level carbapenem

- resistance in heteroresistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Send to Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59(6): 3281-9.
118. Nodari CS, Ribeiro VB, Barth AL. Imipenem heteroresistance: high prevalence among *Enterobacteriaceae Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers. *Send to J Med Microbiol* 2015; 64(Pt 1): 124-6.
119. Gür D, Gülay Z, Arıkan Akan Ö, Aktaş Z ve ark. Türkiye’de Hastane İzolatı Gram-Negatif Bakterilerde Yeni Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç Ve GSBL Tipleri: Çok Merkezli Hitit Sürveyansının Sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4): 537-44.
120. Aral M, Kireççi E, Doğan ŞS. İdrar örneklerinden izole edilen gram negatif bakteriler ve antibiyotiklere direnç oranlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol. Cem. Derg.*,2011; 41(4): 139-42.
121. Özger HS, Karaşahin Ö, Telli G, Gaygisiz G, Civil F, Dizbay M. Nozokomiyal *Klebsiella* türleri arasında karbapenem direnç sıklığı ve fenotipik yöntemlerle direncin değerlendirilmesi. *Flora* 2012; 17(3): 103-10.
122. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP ve ark. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(8): 1209-13.
123. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(8): 2999-3002.
124. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2012; 50(2): 477-9.

125. Kim H, Park JS, Sung H ve ark. Further Modification of the Modified Hodge Test for detecting metallo- $\beta$ -lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Ann Lab Med* 2015; 35(3): 298-305.
126. Us E, Kutlu HH, Tekeli A. Karbapenemaz Üreticisi *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Saptanmasında Modifiye Hodge Testi ile İnhibitör Tabanlı Testlerin Karşılaştırılması. *Ankara Üni Tıp Fak Mec* 2016; 69(3): 151-7.
127. Perçin D, Çolakoğlu S, Durmaz S, Ekincioğlu P. Rektal sürüntü örneklerinde karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* taramasında klasik yöntemlerle ertapenemli EMB besiyerinin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(4): 546-52.
128. Zwaluw K, Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, 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): 1-13.
129. Gauthier L, Bonnin R.A, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the Carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PLoS One* 2017; 12(2).
130. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. *J. Antimicrob. Chemother* 2016; 71(1): 274–6.
131. Bayraktar B, Barış A, Malkoçoğlu G, Erdemir D, Kına N. Comparison of carba NP-direct, carbapenem inactivation method, and b-carba tests for detection of carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 2018; 1-6.
132. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SŞ, Limoncu MH. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin

- saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. Mikrobiyol Bul 2017; 51(3): 269-76.
133. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. Gut Pathog 2014; 6:13.
134. Peter S, Lacher A, Marschal M, Hölzl F, Buhl M, Autenrieth I, Kaase M, Willmann M. Evaluation of phenotypic detection methods for metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2014; 33(7): 1133-41.
135. Ambretti S, Gaibani P, Berlingeri A ve ark. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Microb Drug Resist 2013; 19(3): 212-5.
136. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. J Clin Microbiol 2012; 50(12): 3877-80.
137. Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark. Türkiye’de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2016; 50(1): 21-33.
138. Biçmen M, Sarı A, Gülay Z. OXA-48 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin klonal ilişkilerinin araştırılması. 10. Antimikrobik kemoterapi günleri kitabı, 2012, İstanbul, P48.
139. Alp E, Perçin D, Çolakoğlu S, Durmaz S, Kürkcü CA, Ekinçioğlu P, Güneş T. Molecular Characterization of carbapenem-resistant *K.pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. J Hosp Infect 2013; 84(2): 178-80.

140. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A ve ark. Spread of NDM-1 producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2929-33.
141. Rinder H. Hetero-resistance: an under-recognised confounder in diagnosis and therapy. *J Med Microb* 2001; 50: 1018-20.
142. da Silva AEB, Martins AF, Nodari CS, Magagnin CM, Barth AL. Carbapenem-heteroresistance among isolates of the *Enterobacter cloacae* complex: is it a real concern? *Send to Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2018; 37(1):185-6.

