

T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ENTEROBACTERIACEAE* ÜYELERİNDE KARBAPENEM
DİRENCİ VE DİRENÇTEN SORUMLU ENZİMLERİN
VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Ashı BULUT

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Yrd. Doç Dr. Gülşah AŞIK

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12.SAG.BİL.11 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Tez No: 2014-018
2014-AFYONKARAHİSAR

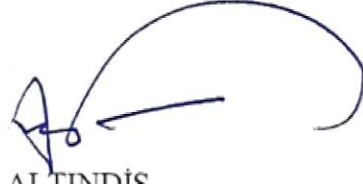
KABUL VE ONAY

Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2014



Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Jüri Başkanı



Doç. Dr. Recep KEŞLİ
Üye



Yrd. Doç. Dr. Gülşah AŞIK
Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Aslı BULUT'un "Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem direnci ve dirençten sorumlu enzimlerin varlığının araştırılması" başlıklı tezi 22/07/2014 günü saat 16.:00'de Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Kağan ÜÇOK

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim süresince yanında çalışmaktan onur ve mutluluk duyduğum, bilgi ve deneyimlerinden yararlanma fırsatı bulduğum, her zaman ilgi, anlayış ve desteğini gördüğüm, dürüstlüğü, yardımseverliği ve çalışma azmini örnek aldığım, üzerimde çok büyük emeği olan ve tez çalışmamın her aşamasında çok büyük emeği geçen, benim için bir danışman hocadan çok öte olan, büyük saygı ve sevgi duyduğum değerli danışman hocam Yrd.Doç. Dr. Gülşah AŞIK'a, eğitim süresi içerisinde mesleki bilgi ve beceri edinmemde büyük emeği olan, değerli hocam Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, öğrencileri olmaktan her zaman onur duyacağım hocalarım Doç. Dr. Orhan Cem AKTEPE'ye, Prof. Dr. Zafer ÇETİNKAYA'ya, Doç. Dr. Özlem MİMAN'a ve Anabilimdalı Başkanımız Doç. Dr. Recep KEŞLİ'ye,

Tezimin pozitif kontrol suşlarını temin etmemizde bizden yardımlarını esirgemeyen, değerli bilim insanları Prof. Dr. Zeynep GÜLAY'a ve Yrd. Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK'e,

En zor anlarımda kapılarını çaldığım, yapıcı eleştirileri ile yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Dr. Özlem YOLDAŞ ve Uzm. Dr. Halil ER'e, çalışmalarım sırasında büyük yardım ve desteğini gördüğüm Arş. Gör. Cengiz DEMİR'e, beni her zaman güler yüzle karşılayan ve sabırla yardımcı olan Arş. Gör. Dr. Özgül ÇETİNKAYA'ya, sıcak bir çalışma ortamı içinde çalışmaktan mutluluk duyduğum laboratuvar çalışanlarımıza,

Hayatımın her döneminde bitmek tükenmek bilmeyen desteklerini, sevgilerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan, kendileriyle gurur duyduğum çok değerli babam ve annem Mustafa-Ayşe BULUT'a, varlıklarıyla hayatıma sevinç ve güzellik katan, iyi ve kötü günümde vazgeçilmezlerim olan, canım ablalarım Dilek ILIK ve Ümmü BULUT'a, sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ash BULUT

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve Onay.....	ii
Önsöz.....	iii
İçindekiler.....	iv
Simgeler ve Kısaltmalar.....	vii
Şekiller Listesi.....	ix
Tablolar Listesi.....	x
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	3
2.1.1. <i>Escherichia</i>	6
2.1.1.1. Morfoloji ve Yapı.....	6
2.1.1.2. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler.....	7
2.1.1.3. Antijenik Yapı.....	7
2.1.1.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri.....	8
2.1.1.5. Epidemiyoloji.....	10
2.1.1.6. Klinik.....	12
2.1.1.7. Tedavi.....	14
2.1.2. <i>Klebsiella</i>	15
2.1.2.1. Morfoloji ve Yapı.....	15
2.1.2.2. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	16
2.1.2.3. Antijenik Yapı.....	16
2.1.2.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri.....	17
2.1.2.5. Epidemiyoloji.....	18
2.1.2.6. Klinik.....	18
2.1.2.7. Tedavi.....	19
2.1.3. <i>Enterobacter</i>	19

2.2. Beta Laktam Antibiyotikler.....	21
2.2.1. Karbapenemler.....	21
2.2.2. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları.....	22
2.2.2.1. İlacın Hücre İçinde Etkin Konsantrasyona Ulaşmaması.....	23
2.2.2.2. Hedef PBP Değişimleri.....	24
2.2.2.3. Karbapenemleri Hidroliz Eden Enzimlerin Varlığı.....	24
3. MATERYAL ve METOT.....	34
3.1. İzolatların Toplanması.....	34
3.2. Besiyerlerin Hazırlanması.....	34
3.3. Suşların İdentifikasyonu.....	36
3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	39
3.5. Karbapenemazların Fenotipik Yöntemle Araştırılması.....	40
3.6. Karbapenemazların Genotipik Yöntemle Araştırılması.....	42
3.6.1. Bakteriyel DNA'nın Ekstraksiyonu.....	43
3.6.2. Primerlerin Hazırlanışı.....	43
3.6.3. PZR Optimizasyonu.....	44
3.6.4. İzolatların Moleküler Olarak Doğrulanması.....	45
3.6.5. PZR ile OXA-48 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	45
3.6.6. PZR ile OXA-58 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	46
3.6.7. PZR ile NDM Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	47
3.6.8. PZR ile VIM Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	47
3.6.9. PZR ile IMP Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	48
3.6.10. PZR ile KPC Gen Bölgesinin Amplifikasyonu.....	48
3.6.11. Agaroz-Jel Elektroforez.....	49
4. BULGULAR.....	51
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	81
ÖZET.....	84

SUMMARY.....	86
KAYNAKLAR.....	88
ÖZGEÇMİŞ.....	107

SİMGELER ve KISALTMALAR

AK	Amikasin
AMC	Amoksisilin-Klavulanik Asit
AMP	Ampisilin
BHI	Brain Heart İnfüzyon
CAZ	Seftazidim
CIP	Siprofloksasin
CN	Gentamisin
CRO	Seftriakson
CTX	Sefotaksim
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EAEC	Enteroagregatif <i>E.coli</i>
EHEC	Enterohemorajik <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvaziv <i>E.coli</i>
EMB	Eozin Metilen Blue
EPEC	Enteropatojenik <i>E.coli</i>
ETEC	Enterotoksijenik <i>E.coli</i>
ETP	Ertapenem
FEP	Sefepim
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz
HUS	Hemolitik Üremik Sendromu
IPM	İmipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LEV	Levofloksasin
LPS	Lipopolisakkarit
MBL	Metallo-Beta-Laktamaz
MEM	Meropenem
MHA	Mueller Hinton Agar
MHT	Modifiye Hodge Testi
MIC	Minimal İnhibitör Konsantrasyon

NDM	New-Delhi Metallo-Beta-Laktamaz
NHSN	National Healthcare Safety Network
PBP	Penisilin Bağlayan Protein
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo N¼kleik Asit
SSS	Santral Sinir Sistemi
TOB	Tobramisin
TSI	Triple Sugar Iron
TZP	Tazobaktam-Piperasilin
VP	Voges Proskauer

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 3.1. Karbapenemaz üreten bir bakteriye ait boronik asit testi.....	41
Şekil 4.1. Örneklerin kliniklere göre dağılımı.....	51
Şekil 4.2. Suşların izole edildiği örneklerle göre dağılımı.....	52
Şekil 4.3. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.....	53
Şekil 4.4. <i>Enterobacter spp.</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri	54
Şekil 4.5. <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri.....	55
Şekil 4.6. MHT pozitif olan izolatların görünümü	56
Şekil 4.7. Karbapenemaz üreten bir bakteriye ait MBL E test	56
Şekil 4.8. İzolatların eksprese ettikleri karbapenemaz genleri	58
Şekil 4.9. Direnç genlerinin jel elektroforez görünümü	59

TABLolar LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin sınıflandırılması.....	5
Tablo 2.2. Beta-laktamazların sınıflandırılması.....	25
Tablo 2.3. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip beta-laktamaz enzimler.....	28
Tablo 3.1. Çalışma sırasında kullanılan besiyerleri.....	35
Tablo 3.2. <i>E.coli</i> , <i>K.pneumoniae</i> , <i>Enterobacter spp.</i> izolatlarının metabolik reaksiyonları.....	39
Tablo 3.3. Karbapenem direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler.....	45
Tablo 3.4. PZR reaksiyon karışımı.....	45
Tablo 3.5. 23S RNA gen bölgesi PZR protokolü	45
Tablo 3.6. OXA-48 gen bölgesi PZR protokolü.....	46
Tablo 3.7. OXA-58 gen bölgesi PZR protokolü.....	46
Tablo 3.8. NDM gen bölgesi PZR protokolü.....	47
Tablo 3.9. VIM gen bölgesi PZR protokolü.....	48
Tablo 3.10. IMP gen bölgesi PZR protokolü.....	48
Tablo 3.11. KPC gen bölgesi PZR protokolü.....	49
Tablo 4.1. Bakteri türlerinin klinik/poliklinik ve izole edilen materyallere göre dağılımı.....	53

Tablo 4.2. Karbapenemaz ürettiği genotipik olarak saptanan izolatların fenotipik yöntem sonuçları.....	57
Tablo 4.3. NDM geni dizi analizisunuçları.....	60
Tablo 4.4. İzolatların fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemlere göre dağılımı.....	61
Tablo 5.1. <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinde karbapenemaz genlerinin dağılımı ile ilgili son 2 yılda yapılan çalışmaların verileri.....	80

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gram negatif bakterilerin beta laktam antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç, özellikle hastane enfeksiyonlarının tedavisinde büyük sorun oluşturmaktadır. *Enterobacteriaceae* üyelerinde sürekli değişim gösteren ve hız kazanan direnç biçimleri son yıllarda artan oranlarda bildirilmektedir (Chang, 2011). Direnç mekanizmalarının ve türlerinin giderek artan çeşitlilik göstermesi, çabuk yayılması ve oluşan bu direnç tiplerinin farklı bakteriler arasında kolaylıkla aktarılabilir olması mevcut tedavi seçeneklerini kısıtlı hale getirmektedir. Bu tür dirençli gram negatif basillerin etken olduğu nozokomiyal enfeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler antibakteriyel spektrumlarının genişliği, AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları nedeniyle ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur (Taşova, 2011). GSBL'lerin tüm dünyada olduğu gibi ülkemiz hastanelerinde de prevalansının %50'nin üzerinde değerlere ulaşması, karbapenem kullanımını artırmış ve sonuçta karbapenemlere direnç gelişimine neden olmuştur (Gülay, 2014). Ülkemizde karbapenem direncinin 2011 Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi verilerine göre %20'nin üzerinde değerlere ulaştığı bildirilmiştir (Jones, 2014).

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenem direnci, yüksek düzey AmpC ve GSBL üretimi ve porin kaybı gibi birleşik mekanizmalarla oluşabileceği gibi, temel mekanizmanın karbapenemaz üretimi olduğu bilinmektedir (Sarı, 2005; Gülay, 2014). Karbapenemazlar, *Enterobacteriaceae* türlerinde dahil olduğu Gram negatif mikroorganizmalar arasında artan sıklıkla karşımıza çıkan direnç mekanizmalarındandır. Farklı moleküler sınıfta yer alan ve plazmidler aracılığıyla aktarılan bu enzimler özellikle son birkaç yıldır tüm dünyadan bildirilmektedir. Ülkemizde de IMP, VIM gibi metallo beta laktamazların yanı sıra daha yüksek

oranlarda OXA karbapenemazların varlığı bildirilmektedir. Son bir yıl içerisinde ülkemizden KPC-2 gen varlığının bildirilmesi ve NDM'nin yayılımı ile *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenem direnç sorununun boyutlarının artacağı düşünülmektedir (Karatuna, 2014).

Karbapenemaz üreten organizmaların tanımlanması bölgemizdeki dirençli izolatların yayılımı ve enfeksiyon kontrolü açısından önem taşımaktadır. Bu noktadan hareketle çalışmamızda, hastanemiz Mikrobiyoloji laboratuvarında son bir yıl içerisinde izole edilen, karbapenemlerden en az birine dirençli ya da orta duyarlı bulunan, enfeksiyon etkeni olarak en sık soyutlanan türleri içeren *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem grubu antibiyotiklere direnç oranlarının belirlenmesi ve bu dirençten sorumlu moleküler mekanizmaların araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae ailesi, tıbbi önemi olan gram-negatif basiller içinde en büyük ve heterojen ailedir. Bu ailedeki bakterilerin birçoğu insan ve hayvanların barsak veya barsak dışı floralarında, bitkilerde, toprakta, suda; patojen, kommensal ve saprofit olarak bulunmaktadır (Bilgehan, 2004). İnsanda septisemi, menenjit, cerrahi yara enfeksiyonları, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları gibi hemen her doku ve organı tutan enfeksiyonlarda, bu aileden bir bakteri etken olarak izole edilebilir. Aile içinde 40'dan fazla cins ve 150'den fazla tür bulunmaktadır. Bu türler biyokimyasal özelliklerine, antijenik yapılarına, DNA-DNA hibridizasyon ve 16sRNA dizilimlerine göre sınıflandırılmışlardır (Gür, 2009). Bu aile içinde bulunan tıbbi önemi olan başlıca patojen cinsler *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia*, *Providencia*'dır. *Enterobacteriaceae* ailesinin sınıflandırılması Tablo 2.1'de verilmiştir (Ustaçelebi, 1999). Genellikle homojen boyanan 2-3 µm boyunda, 0,5-0,6 µm eninde spor oluşturmayan, gram negatif basillerdir. Tüm üyeleri aerobik ve anaerobik ortamda (fakültatif anaerob), birçok seçici ya da seçici olmayan besiyerinde hızla ürerler. Optimum üreme derecesi 37°C'dir. Çoğu pigmentsiz olmasına rağmen, bazıları kırmızı veya sarı pigment yapabilir. *Enterobacteriaceae* türlerinin çoğu eritrositleri eriten hemolizin salgılar. Hemolizin lökositleri ve diğer hücreleri de etkileme özelliği bulunmaktadır. D-glukozu ve diğer karbonhidratları gaz oluşturarak veya gaz oluşturmadan fermente ederler. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinin üç ortak özelliği; glukozu fermente etmeleri, sitokrom oksidaz aktivitelerinin olmaması ve nitratları nitrite indirgemeleridir. Bu bakterilerin oksidaz reaksiyonları negatif, katalaz pozitiflerdir (Bilgehan, 2004). *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan bakterilerin hücre yüzeylerinde başlıca üç temel yapı vardır.

Bunlar sitoplazma zarı, peptidoglikan tabaka ve dış zardır. Dış zar fosfolipit, protein ve lipopolisakkarit (LPS) tabakalarından meydana gelmiştir. Hücre yüzeyinde ayrıca mukoza yüzeylerine tutunmayı sağlayan pilus ve hareketi sağlayan flagellaları bulunur. Peptidoglikan, LPS ve fosfolipidler sitoplazma zarı tarafından sentezlenir. LPS tabakası Lipid A, kor oligosakkarit ve tekrarlayan oligosakkarit zincirleri olmak üzere üç bölüme oluşur. Kor poligosakkariti gram negatif bakterilerin büyük bir grubunda ortaktır. Kor bölgesi bir taraftan poligosakkarit zincirine, diğer taraftan Lipid A'ya bağlıdır. Lipid A disakkarit yapısıdır ve endotoksin aktivitesinden sorumludur. Tekrarlayan oligosakkarit zinciri oldukça heterojen bir yapıdadır. Türler arasında ve aynı tür içinde de değişiklik gösterir. Bu yapının varlığına ya da yokluğuna göre koloni şekli düzgün (S: smooth) veya düzensizdir (R: rough). Kapsüllü türler M (mukoid) koloni yaparlar. Kapsüllerinde M ve K olmak üzere iki çeşit poligosakkarit bulunur. Bakteriye kurumaya karşı koruyan M antijeni veya kolanik asit cinsleri arasında ortaktır ve çapraz reaksiyona sebep olmaktadır. K poligosakkarit antijeni serotipe özeldir ve bakteriyi fagositozdan korur. O antijeni ile aglutinasyonu engellediği için ısıtılarak bakteriden uzaklaştırılır (Özkuyumcu, 2009).

Enterobacteriaceae ailesi içindeki bakterilerin somatik (O), hareketli olanların kirpik (H), kapsüllü olanların kapsül (K) antijenleri vardır. Kirpik antijenleri türlerin sınıflandırılmasında ve epidemiyolojik çalışmalarda önemlidir (Murray, 2009).

Virülanslarında kapsül, kirpik, toksin, fimbriya, enterotoksin, siderofor ve diğer faktörler rol oynamaktadır.

Tablo 2.1. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Sınıflandırılması

Familya	Cins	Tür
I. <i>Escherichieae</i>	I. <i>Escherichia</i>	<i>E. coli</i> , <i>E. blatae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i>
	II. <i>Shigella</i>	<i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>
II. <i>Edwardsiellae</i>	<i>Edwardsiella</i>	<i>E. tarda</i> , <i>E. hoshina</i> , <i>E. ictaluri</i>
III. <i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. typhi</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. enteridis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. Pullorum</i>
IV. <i>Citrobacteriaceae</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. Amalonicus</i>
V. <i>Klebsielleae</i>	I. <i>Klebsiella</i>	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozanae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. omithinolytica</i>
	II. <i>Enterobacter</i>	<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. dissolvens</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. nimipressuvali</i> , <i>E. nimipressuvalis</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i>
	III. <i>Hafnia</i>	<i>H. alvei</i>
	IV. <i>Serratia</i>	<i>S. marcescens</i> , <i>S. lique</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. ficaria</i>
VI. <i>Proteeae</i>	I. <i>Proteus</i>	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. pennei</i> , <i>P. myxofaciens</i>
	II. <i>Morganella</i>	<i>M. morganii</i>
	III. <i>Providencia</i>	<i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. rustigianii</i>
VII. <i>Yersinieae</i>	I. <i>Yersinia</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. aldovae</i>
VIII. <i>Erwinieae</i>	I. <i>Erwinia</i>	<i>E. amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>
Herhangi bir aile içine Yerleştirilmemiş cinsler	<i>Arsenophonus</i> <i>Budvicia</i> <i>Buttiauxella</i> <i>Cedecea</i> <i>Kluyvera</i> <i>Leclercia</i> <i>Leminorella</i> <i>Moellerella</i> <i>Obesumbacterium</i> <i>Pantoea</i> <i>Pragia</i> <i>Rahnella</i> <i>Tatumella</i> <i>Xenorhabdus</i> <i>Yokonella</i>	

Enterobacteriaceae ailesi nozokomiyal enfeksiyonların en büyük sorumluları arasında gösterilmektedir. 2009-2010 National Healthcare Safety Network (NHSN)

raporlarına göre nozokomiyal ilişkili enfeksiyon oranlarına bakıldığında gram negatif bakteriler arasında en çok izole edilen türler *Escherichia coli* (%11,5), *Klebsiella spp.*(%8), *Enterobacter spp.*(%4,7)'dir (Sievert, 2013).

2.1.1. *Escherichia*

Escherichia cinsinde tıbbi önemi olan tür *E.coli*'dir. *E. coli* 1885'de Escherich tarafından *Bacterium coli commune* adı ile tarif edilmiş, daha sonra barsak dışı enfeksiyonlarda da patojen olarak tanımlanmıştır. 1919'da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilene kadar *Bacterium coli* adı kullanılmıştır (Topçu, 2002). *E.coli* barsak florası içinde bulunan en yaygın fakültatif anaerop türdür. Diğer koliform bakterilerin aksine doğada bulunmazlar. Bu nedenle, su ve besin maddeleri gibi çevreden alınan örneklerde *E.coli*'nin izole edilmesi test edilen maddelerin dışkı ile kontaminasyonun bir işareti olarak bilinmektedir. *E.coli* toplum kaynaklı enfeksiyonlar oluşturabildiği gibi nozokomiyal enfeksiyonlara da neden olduğu bilinen fırsatçı bir patojendir (Özkuyumcu, 2009).

2.1.1.1. Morfoloji ve Yapı

E.coli 1-1,5 µm eninde, 2-6 µm boyunda düz, uçları yuvarlak gram negatif basillerdir. Granül içermez ve homojen boyanırlar. Mikroskopta kapsül oluşumu nadirdir, fakat birçok suşta polisakkarit yapıda M antijeni içeren bir mikrokapsül veya polisakkarit yapıda K antijeni içeren slime tabaka bulunabilir. Bunlar mikroskopta farkedilemeyen ama bu antijenlere karşı hazırlanmış bağışık serumlarla yapılan serolojik deneylerle saptanabilen yapılardır (Topçu, 2002). *E.coli* suşlarında çoğunlukla fimbria bulunur. Fimbrialar protein yapıda olup hücrelere tutunma özelliği ile yardımcı virülans faktörü olarak rol oynarlar. Çoğu suş peritriş kirpikleri ile hareketlidir (Özkuyumcu, 2009).

2.1.1.2. Üreme ve Biyokimyasal Özellikler

E.coli genel üretim besiyerlerinde üreyebilir. Optimal üreme 37°C'de, nötral ortamda ve oksijen varlığında olur. Ancak 20°C-44°C aralığında üreyebilirler. Buyyonda homojen bulanıklık oluştururlar. Basit besiyerlerinde 18-24 saatte 3-4 mm çapında S tipi koloni, kapsüllü olanlar M tipi koloni yaparlar. Kanlı agarda bazı suşlar β-hemoliz yaparlar. Mac Conkey agarda, etrafında safra tuzlarının oluşturduğu pembe alanlarla çevrili laktoz pozitif koloniler şeklinde gözlenirler. Eozin Metilen Blue (EMB) agarda suşların çoğu, metalik refle veren yeşil-siyah koloniler oluşturur (Özkuyumcu, 2009).

E.coli metabolik olarak aktif bir bakteridir. Glukoz ve diğer karbonhidratlara etki ederek asit ve gaz oluştururlar. Aynı zamanda laktoz, mannitol, sorbitol, maltoz, ksiloz, trehaloz, arabinoz ve mannozu fermente ederken, inositol, adonitol, sellobioz ve arabitol fermentasyonunu gerçekleştirmez. *E.coli* suşlarının indol, metil-red testi, lizin dekarboksilaz, O-nitrophenyl-beta-D-galactoside (ONPG) ve hareket testi pozitif iken, Voges-Prauskauer reaksiyonu, sitrat kullanımı, H₂S oluşumu, üre ve jelatin hidrolizi, fénilalanin deaminaz, lipaz, DNaz, KCN'de üreme ve malonat kullanımı negatiftir. *E.coli*'nin hareketsiz, laktozu fermente etmeyen, glukozdan gaz oluşturmayan suşları inaktif *E.coli* olarak tanımlanmaktadır (Bilgehan, 2004; Bozkaya, 2005).

2.1.1.3. Antijenik Yapı

E.coli suşları O, H ve K antijenlerine göre tiplendirilirler. O antijenleri (somatik veya hücre duvarı antijenleri) LPS'in polisakkarit kısmında bulunurlar. Bu antijenler sıcağa dayanıklıdır ve pekçok farklı *Enterobacteriaceae* cinslerinde ortak olabilirler. O antijenlerinden, enterik gram negatif basillerin serolojik tiplendirilmesinde yararlanır. H antijenleri kirpik antijenleridir. *E.coli* gibi hareketli *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunur. K antijenleri genellikle kapsülle veya daha

az sıklıkla olmak üzere fimbriyalarla ilişkili antijenlerdir. *E.coli* suşları arasında serolojik olarak farklı pek çok O, H, K antijenleri vardır ve spesifik serotipler belirli hastalıklar ile ilişkilidir (Lipincott, 2010).

2.1.1.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri

E.coli'nin majör virülans faktörleri kapsül, enterotoksin ve salgıladığı enzimlerdir. Konak hücrelerine tutunmayı sağlayan fimbriyalar, antijenik ve fonksiyonel olmak üzere iki farklı özellik gösterir. Tutunma özelliğine göre enfeksiyonun geliştiği anatomik bölge farklıdır. Antijenik özelliğe sahip kolonizasyon faktörleri gastroenteritten sorumludur. Bazıları hemolizin salgılar. Sideroforlar ise bir diğer virülans faktörüdür. Bu faktörler, gereksinim olan demiri konak organizmada bulunan transferin ve laktoferin gibi demir bağlayan moleküllerden sağlar (Bozkaya, 2005).

E.coli'nin neden olduğu enfeksiyonların çoğu endojen kaynaklı olmasına karşın gastroenterit oluşturan suşları ekzojen kaynaklıdır. Gastroenterit yapan *E.coli* suşları 5 büyük gruba ayrılmaktadır: Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), Enteroagregatif *E.coli* (EAEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), Enteroinvaziv *E.coli* (EIEC)'dir. Bunlardan ETEC, EPEC, EAEC ince barsağı tutan sekretuar diyare yaparken, EHEC ve EIEC primer olarak kalın barsağı tutmaktadır (Murray, 2009).

ETEC: ETEC suşları ile gelişen enfeksiyonun patogenezinde adezin ve enterotoksin olmak üzere iki önemli virülans faktörü rol alır. ETEC suşlarında plazmid tarafından kodlanan ve ince barsakta mikrovilluslardaki özel reseptörlere bağlanan adezyon molekülleri bulunur. Kolonizan faktör antijenleri (CFA/I, CFA-II) sadece ETEC suşlarında bulunur. Diğer bir virülans faktörü ise enterotoksindir. ETEC suşlarında ısıya duyarlı LT (labil toksin) ve ısıya dirençli ST (stabil toksin) olmak üzere iki

toksin vardır. İki tip LT (LT-I ve LT-II) toksini bulunur. Her ikisi de aynı yapı ve etki mekanizmasına sahiptir. Fakat LT-II ETEC suşları tarafından daha az üretilir. GM1 gangliyosidlerine bağlanan B alt ünitesi toksinin A alt ünitesinin hücre içine girmesini sağlar. A ünitesinin girdiği hücrede adenilat siklaz aktivitesi uyarılarak klorun hücreden çıkışı artar, sodyumun hücre içine girişi azalır. Sonuç olarak barsağa fazla sıvı salgılanması sonucunda sekretuar diyare meydana gelmektedir (Özkuyumcu, 2009). ST'nin de STI (STa) ve STII (STb) olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. STa enterosit apikal membranında guanil siklaz C'ye bağlanır. Reseptörü aktive eder ve siklik guanozin monofosfat oluşumuna neden olarak sıvı kaybına yol açar. STb farklı bir etki mekanizmasına sahiptir. Domuzlardan izole edilen suşlarda rastlanmıştır. İnsanlarda meydana gelen ETEC enfeksiyonlarında LT-I ve STa toksinleri rol alır (Topçu, 2002).

EPEC: EPEC suşları toksin oluşturmaz ve invaziv özellik göstermezler. EPEC suşları barsak hücrelerine EspA filamanları ile tutunur ve tipIII sekresyon sistemini kullanarak epitel hücrelere intimin reseptör molekülünü enjekte eder. Dış membranda eksprese olan intimin reseptörüne bakteride bulunan ve önemli bir virülans faktörü olarak kabul edilen intiminin bağlanması hücrede bir dizi olayın başlamasına neden olur. Hücrede kalsiyum konsantrasyonu artar, hücre proteinleri fosforile olur ve sonuçta tirozin protein kinaz aktivitesi tetiklenerek kalsiyum salınımı oluşur. Bu durumda mikrovillus proteininin (villi) işlevi bozulur ve mikrovillus harabiyeti meydana gelir. Bunun sonucunda barsakta emilim bozulur ve diyare meydana gelir (Murray, 2009; Özkuyumcu, 2009).

EHEC: Verotoksin oluşturan *E.coli* suşları olarak adlandırılabilir. Aynı zamanda *Shigella dysenteriae* tipI'in oluşturduğu toksin ile benzerlik gösterdiği için toksin Shiga benzeri toksin olarak da bilinmektedir. Verotoksin lizojenik bir faj tarafından kodlanır. Verotoksinin VT1 ve VT2 olmak üzere iki tipi bulunur. Toksinde bulunan B alt ünitesi konak hücrede bulunan spesifik bir glikolipide bağlanır. Bu glikolipid

ise barsak villuslarında ve böbrek endotelial hücrelerinde bulunur. A alt ünitesi hücrede protein sentezini inhibe eder ve hücre ölümü meydana gelir. Bulaş kaynaklarının en önemlisi bakteri ile kontamine olan sığır etlerinin tüketimidir. O157: H7 serotipi, verotoksin üreten *E.coli* serotipleri arasında en sık görülendir (Topçu, 2002; Özkuyumcu, 2009).

EIEC: Bakteri kolon epitel hücrelerine tutunarak endozom içinde hücre içine girer. Fagositik vakuolü patlatır ve sitoplazmaya geçerek çoğalır. Daha sonra hücrenin aktin filamanlarını tekrar düzenler ve komşu hücreye geçer. Meydana gelen epitel hücre hasarı ve enflamasyon sebebiyle, kolonda ülserler oluşur (Özkuyumcu, 2009).

EAEC: Hep-2 ve HeLa hücrelerine adherans gösterir. Yüzeyleri adheranstan sorumlu çok ince fibriler yapıyla kaplıdır. Bu fimbrialar bakteri üremesi sırasında bakterinin kümeler oluşturmaya neden olur. Bu yüzden agregatif ismini almıştır (Topçu, 2002).

2.1.1.5. Epidemiyoloji

E.coli doğumdan birkaç saat sonra barsak florasını oluşturmaya başlar. *E.coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlar dünyanın her yerinde yaş ve cinsiyet ayrımı yapmaksızın görülmektedir. Oluşturduğu gastrointestinal enfeksiyonlar, virotip özelliğine göre endemik bölge ve konak farkı göstermektedir (Ustaçelebi, 1999).

Barsak patojeni EPEC suşlarında bulaşma insandan insana fekal-oral yolla veya hazırlanan bebek mamalarının bu suşlarla kontaminasyonu ile olur. Bu olguların büyük çoğunluğu 2-3 yaşından küçüklerde görülebildiği gibi erişkinlerde de nadir olarak görülmektedir. Anne sütü ile beslenenlerde EPEC enfeksiyonlarına nadiren rastlanır. Çeşitli salgınlarda ölüm oranı %0 ile %70 arasında bulunabilir.

Sporadik olgulara da rastlanır, fakat daha çok çocuk klinikleri ve yuvalarda salgınlar görülür. EPEC suşları gelişmemiş ülkelerde her mevsimde görülebilir. Fakat daha çok yaz aylarında görülür (Topçu, 2002).

ETEC suşlarında ise fekal-oral yolla ve kontamine su ve besinlerle bulaş görülmektedir. Bu enfeksiyon gelişmemiş ülkelerde, gelişmiş ülkelere seyahat eden kişilerde görülür. Bu yüzden turist diyaresi olarak da bilinir. Enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerde daha çok çocuklarda, bu bölgeler dışında ise her yaşta görülebilir. Gelişmemiş ülkelerde 2 yaşına kadar çocukların yılda 1-2 defa ETEC ishali geçirdiği belirtilmiştir. Mevsimsel özellik göstermez.

EIEC suşları ise daha çok kontamine besinlerle bulaşır. Endemik veya epidemik olarak görülebilir. Tüm dünyada nadir gözlenir.

EHEC suşlarında bulaş et içeren besin maddeleri, bazen süt ve su yolu ile olur. Hamburger eti, salam, çiğ süt, pastörize edildikten sonra kontamine olmuş sütlerle meydana gelen enfeksiyon salgınları bulunmaktadır. ABD, Kanada, Avrupa gibi gelişmiş ülkelerde daha sık görülür. Genellikle bakımevleri, okullar gibi toplu yaşanan alanlarda salgınlar görülebilir. Beş yaşından küçük çocuklarda ve 65 yaş üzerindekilerde daha sık görülür.

EAEC suşlarının neden olduğu ishali epidemiyolojisi çok açıklanamamıştır. Gelişmiş ülkelerde ishali çocuklardan izole edildiği, diğer ülkelerde ise bazı olguların seyahatle ilişkilendirildiği belirtilmektedir.

Barsak dışı *E.coli* enfeksiyonlarında idrar yolları enfeksiyonu en sık rastlanan enfeksiyondur. Toplumda kazanılmış idrar yolları enfeksiyonları erişkinlerde ve kadınlarda sık gözlenir. Hastanelerde sık rastlanır. Sonda ve diğer invaziv aletlerin kullanımını asendan enfeksiyon olasılığını çok artırır. Kalıcı sonda uygulamalarında ise idrar yolları enfeksiyonlarının görülmesi kaçınılmazdır. Fakat bu uygulamalarda

Proteus, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter* gibi bakterilerinde bulaştırılması, nozokomiyal *E.coli* enfeksiyonlarında azalmaya neden olmuştur (Lange, 2010; Topçu, 2002; Kiraz, 2011).

2.1.1.6. Klinik

A. Ekstraintestinal Enfeksiyonlar

Üriner Sistem Enfeksiyonu

Toplum kökenli ya da nozokomiyal idrar yolu enfeksiyonlarına neden olurlar. Flora üyesi olan *E.coli* suşları üretrayı kontamine eder, asendan yolla mesaneye yayılır, böbreğe ya da prostata ulaşabilir. *E.coli* suşlarının birçoğu idrar yolu enfeksiyonuna neden olsa da enfeksiyon bazı serotipler ile daha sık gözlenir. Bu bakteriler, mesaneyi ve üst üriner sistemi kaplayan hücrelere tutunmayı sağlayan adezinlere sahip olduğu için eritrositler ile diğer hücre tiplerinin erimesine neden olan hemolizin HlyA üretmeleri nedeniyle virülandır (Murray, 2009).

Neonatal Menenjit

1 aydan küçük infantlarda Santral Sinir Sistemi (SSS) enfeksiyonlarının çoğunun etkeni *E.coli* ve grup B streptokoklardır. *E.coli* suşlarının çoğu K1 kapsüler antijenine sahiptir. Bu serogrup hamile bayanlarda ve yeni doğmuş infantların gastrointestinal sistemlerinde sık görülür. Fakat bu serogrubun yenidoğanlarda nasıl hastalık yaptığı henüz anlaşılmamıştır (Murray, 2009; Özkuyumcu, 2009).

Septisemi

E.coli'ye bağlı septisemiler genellikle idrar yolu ya da gastrointestinal kanal kökenlidir. İmmün yetmezliği olan kişilerde ve primer enfeksiyonu abdomende veya SSS'de oluşan vakalarda *E.coli* septisemisinin mortalitesi yüksektir (Murray, 2009).

B. Gastrointestinal Enfeksiyonlar

Gastrointestinal sistem enfeksiyonlarına neden olan *E.coli* grupları;

ETEC: En sık gelişmekte olan ülkelerde görülür ve genellikle turist diyarelerinin etkenidir. Bulaşma insan çıkartılarıyla kontamine besinler ve sularla veya birey teması ile olur. ETEC suşları ile gelişen enfeksiyonda, kramplar ile birlikte sulu bir dışkılama olur. Dışkıda kan ve mukus bulunmaz. Kusma ve ateş görülmez. Yaklaşık olarak 4-5 gün içinde hastalık kendini sınırlar (Lange, 2010; Özkuyumcu, 2009).

EPEC: Özellikle hijyen koşullarının kötü olduğu yerlerde süt çocuğu diyarelerinin önemli etkenlerindedir. Bulaşın temel yolu insandan insana olan bulaştır. EPEC suşları ile gelişen sulu diyarede kusma ile birlikte ishal görülür. Ateş çok yükselmez veya hiç yoktur. Dışkıda kan ve mukus nadir görülmektedir. Genellikle 1 hafta içinde kendini sınırlamaktadır. Altta yatan hastalığı olan çocuklarda, malnütrisyonlularda ve bebeklerin özellikle ilk aylarında O111 serogrubu ile meydana gelen enfeksiyonlar ölümcül olabilir (Lange, 2010, Özkuyumcu, 2009).

EHEC: Kalın barsaklara yapışan EHEC ürettiği bir ekzotoksin ile mukozal invazyon ya da inflamasyon olmaksızın ağır, kanlı diyareye neden olur. Sıcak mevsimlerde ve 5 yaş altındaki çocuklarda sık görülür. Komplikasyon olmadığı durumda kendini 1 hafta içerisinde sınırlar. Hemolitik üremik sendromu (HUS) O157:H7 ile enfekte

olan 10 yaşın altındaki çocukların %5-10'da görülen bir komplikasyondur. HUS'un neden olduğu komplikasyonlar; akut böbrek yetmezliği, trombositopeni ve mikroanjiopatik hemolitik anemidir. HUS'lu hastaların %3-5'inde ölüm görülür, %30'da ise hipertansiyon, böbrek fonksiyon bozukluğu gelişebilir (Lange, 2010, Özkuyumcu, 2009).

EIEC: EIEC enfeksiyonlarının bulaşı kontamine su ve yiyeceklerin alınmasıyla olur. İnsandan insana bulaş nadir görülür. Çoğunlukla sulu ishallere neden olur. Vakaların az bir kısmında mukuslu ve kanlı ishal, ateş, karın ağrısı ve tenesmus ile seyreden bakteriyel klinik tabloların oluşumuna neden olur. Ölüm çok nadirdir (Özkuyumcu, 2009; Lange, 2010).

EAEC: Gelişmekte olan ülkelerde ve bu ülkelere seyahat edenlerde persistan diyare etkeni olarak infantlarda dehidratasyona yol aması ile bilinir. Kronik diyare etkeni olup, küçük çocuklarda büyüme geriliğine neden olan birkaç bakteriden birisidir (Murray, 2009; Kiraz, 2011).

2.1.1.7. Tedavi

E.coli enfeksiyonlarının tedavisi enfeksiyon odağına ve özgül izolatın gösterdiği direnç profiline bağlıdır. *E.coli* suşlarının büyük bir kısmı TEM-1 beta-laktamazını oluşturur ve aminopenisilinlere, karboksipenisilinlere ve reidopenisilinlere dirençli bunular. Bazı suşların GSBL oluşturduğu bunların da önce duyarlı bulunduğu geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerine tedavi sırasında direnç geliştirebileceği düşünülebilir. *E.coli* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan antibiyotikler şu şekildedir; komplikasyonsuz idrar yolu enfeksiyonu tedavisinde trimetoprim-sulfametoksazol veya ampisilin düşünülürken, *E.coli* sepsisi için parenteral antibiyotik tedavisi gerekir, gentamisin gibi bir aminoglikozidle birlikte ya da tek

başına kullanılan üçüncü kuşak sefalosporinler kullanılır. Neonatal menenjit tedavisi için ampisilin ile sefotaksim kombinasyonu önerilmektedir.

E.coli'nin neden olduğu gastrointestinal enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisi genel olarak endike değildir. *E.coli* diyarelerinin tedavisinde esas olan hastanın kaybettiği sıvının verilmesidir. Bununla birlikte trimetoprim-sulfametoksazol ya da löperamid kullanılması belirtilen süreyi kısaltabilir (Topçu, 2002; Lange, 2010).

2.1.2. *Klebsiella*

Klebsiella cinsi *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Serratia* ile birlikte *Enterobacteriaceae* ailesinde *Klebsiella* kabilesinde yer alır. Tıbbi olarak en önemli olan tür *K.pneumoniae*'dir. Doğada bulunduğu gibi, insanda deri, boğaz ve barsakta kommensal olarak da bulunur. Lober pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları ve çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlarda etkindir. *Klebsiella* adını 19. yy sonlarında yaşamış olan Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'den almıştır. Daha sonra *K.pneumoniae*'nin yaptığı ağır öldürücü pnömoni tablosu Carl Friedlander adlı araştırmacı tarafından tanımlanmış ve bakteri uzun yıllar Friedlander basili olarak isimlendirilmiştir (Topçu, 2002). *Klebsiella* türleri; *K.pneumoniae*, *K.ozanae*, *K.granulomatis*, *K.oxytoca*, *K. rhinoscleromatis*, *K.ornithinolytica*, *K.planticola*, *K.trevisanii* ve *K.terrigens*'dir. *Klebsiella* cinsinde hastalık oluşturan 3 tür; *Klebsiella pneumoniae*, *K.oxytoca* ve *K.granulomatis*'dir.

2.1.2.1. Morfoloji ve Yapı

Tek tek, ikili veya kısa zincir şeklinde görülen, hareketsiz bir bakteridir. 0,7-1,5 µm eninde, 2-5 µm boyunda gram negatif, sporsuz, kapsüllü bakterilerdir. Suşların çoğu ilk izolasyonda, nemli ve karbonhidrat bakımından zengin besiyerlerinde yapılan kültürde bakteri çevresinde geniş bir kapsül oluşturur. Kapsül klinik örnekten

hazırlanan gram preparatında bakteri etrafında boyanmamış ve her zaman düzgün olmayan bir bölge olarak görülür. Çini mürekkebi ile hazırlanan preparatta kapsülü daha düzgün görmek mümkündür. Kapsülsüz bakteriler ya da slime tabakası gibi az kapsül oluşturan suşlarda görülür. *Klebsiella* cinsinde kirpik bulunmaz. Solunum yollarından izole edilen *K.pneumoniae* genellikle tipI fimbria oluşturur. Diğer kaynaklardan izole edilen suşlarda tipIII fimbria da bulunabilir. *K.pneumoniae*'da bazı suşlar, *K.ozaenae* ve *K.rhinoscleromatis*'de bütün suşlar fimbriasızdır (Topçu, 2002; Bilgehan, 2004).

2.1.2.2. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

Klebsiella fakültatif anaerop bir bakteridir. Optimal üreme ısısı 37°C'dir. Fakat *K.pneumoniae* dışındaki türler 4°C-44°C aralığında üreyebilmektedir. Basit besiyerlerinde 18-24 saatte S tipi koloni, kapsüllü olanlar M tipinde koloni oluştururlar.

Klebsiella metabolik olarak aktif bir bakteridir. Birçok karbonhidratı asit ve gaz oluşturarak fermente eder. *K.pneumoniae* üreyi ve eskulini hidrolize eder. Metil kırmızısı reaksiyonu negatif, Voges-Prauskaue reaksiyonu ise pozitiftir. Sitrati tek karbon kaynağı olarak kullanabilir. KCN varlığında üreyebilir. *K.pneumoniae* ve *K.oxytoca*'nın ayırımında kullanılan indol testi, *K.pneumoniae*'de negatif, *K.oxytoca*'da ise pozitiftir. H₂S üretmez, fenilalanini deamine etmezler (Bilgehan, 2004; Ustaçelebi, 1999).

2.1.2.3. Antijenik Yapı

Klebsiella cinsinde O antijenleri diğer gram negatif bakterilerdeki gibi, bakterinin endotoksinini oluşturur. Diğer bakterilerden farklı olarak belirgin bir kapsüle sahip

olup, en önemli anijenik yapıları K antijenleridir (Erdem, 1999). K antijenine göre serotiplendirmeleri yapılmaktadır. *Klebsiella*'da 80'den fazla K antijeni tipi tanımlanmıştır. K antijenleri fagositozu ve enfeksiyon bölgesine fagositlerin göçünü engelleyen virülans faktörleridir.

2.1.2.4. Patogenez ve Virülans Faktörleri

Klebsiella, doğada cansız ortamlarda ve hayvan floralarında yaygın bir şekilde bulunmaktadır. İnsanlarda deride, üst solunum yollarında ve barsakta düşük oranlarda kommensal olarak bulunur. Fakat hastanede yatan hastalarda antibiyotik kullanımına bağlı olarak hem kolonizasyon oranı hem de bakteri sayısı hızla artar. Çoklu ilaç direncine sahip olması, kuruluğa ve çevre koşullarına dayanıklı olması nedeniyle hastane ortamında kolaylıkla yayılabilmektedir. Boğaz, deri ve kolonda hızla kolonize olur ve immün sistemi baskılanmış hastalarda enfeksiyona yol açar. Hastane ortamında kaynak endojen olabileceği gibi, ekzojen kaynaklı da olabilir. Bu nedenle toplumda nadir olarak gözlenen *Klebsiella* enfeksiyonlarına nazaran nozokomiyal enfeksiyonlara daha sık rastlanır.

Klebsiella, *Enterobacteriaceae* ailesinin ortak virülans faktörlerine sahiptir. Kapsül bakteriyi, fagositoza ve serumun öldürücü etkisine karşı dirençli kılar. Bazı suşlar plazmidde kodlanmış olan enterotoksin salgılar. Bu toksin *E.coli*'nin ısıya dayanıklı ST (stabil toksin) ve ısıya duyarlı LT (labil toksin) ile benzerlik gösterir. Ayrıca suşların çoğu beta-laktamaz salgılayarak beta-laktam antibiyotikleri etkisiz hale getirir (Lange, 2010; Özkuyumcu, 2009).

2.1.2.5. Epidemiyoloji

Toplumda seyrek olarak görülen *Klebsiella* enfeksiyonları nozokomiyal enfeksiyonlar olarak daha çok görülmektedir. Özellikle gelişmekte olan ülkelerde çoklu direnç gözlenir. Nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde *K.pneumoniae* enfeksiyonu ilk sıraları almaktadır. Çeşitli direnç mekanizmaları ile birçok antibiyotiğe dirençli olması, aynı zamanda kuruluğa ve dış koşullara direnci hastane ortamında kolayca yayılmasına neden olur. Hastane enfeksiyonları endojen ve ekzojen kaynaklı salgınlar olarak karşımıza çıkmaktadır. *K.oxytoca*'nın epidemiyolojisi *K.pneumoniae*'ninkine benzer. İkisi de infantlar, ileri yaşlılar, özellikle solunum sisteminde olmak üzere sistemik başka hastalığı olanlar, yoğun bakımda yatanlar, damar içi katater ve idrar sondası uygulananlar ve geniş spektrumlu antibiyotiklerle tedavi edilenler için daha büyük enfeksiyon riski oluştururlar. *K.rhinoscleromatis* ve *K.ozaenae* Afrika, Uzak Doğu, Güney Amerika, Doğu Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde oldukça nadir rastlanan ozene ve rinosklerom hastalıklarına yol açar (Topçu, 2002; Murray, 2009).

2.1.2.6. Klinik

Toplum ve nozokomiyal kaynaklı lobar pnömoniye sebep olan *K.pneumoniae* ve *K.oytoca* en sık izole edilen türlerdir. *Klebsiella* türlerinin neden olduğu pnömoniler sıklıkla alveoler boşlukların nekrotik yıkımına, kavite ve kanlı balgam oluşumuna sebep olurlar. *K.pneumoniae*, pnömoniden başka üriner yol, yara enfeksiyonlarına ve bakteriyemilere yol açar. Yenidoğan ünitelerinde plazmid aracılı çoklu dirençli *Klebsiella*'lara bağlı hastane enfeksiyonları sık görülür (Murray, 2009; Işık, 2007). *K. ozaenae* burun mukozasında atrofi, yeşil-sarı ve çok kötü kokulu burun akıntısı ile seyreden ozene olgularında saptanır. *K.rhinoscleromatis* burun ve farenkste destrüktif bir granülomaya neden olmaktadır. *K.granulomatis* tropikal bölgelerde donovanoz veya granüloma inguinale etkenidir. Kültürde üretilmesi zordur. Genital

ülserlerden yapılan Giemsa boyamada mononükleer hücreler ya da histiyositler içinde donovan cisimciklerinin görülmesiyle tanı konulur (Kiraz, 2011; Murray, 2009).

2.1.2.7. Tedavi

Bu organizmaların antibiyotiklere direnci geniş çapta değişiklikler gösterdiği için ilaç seçimi duyarlılık testlerinin sonucuna bağlıdır. Nozokomiyal kaynaklı enfeksiyonlarına neden olan etkenler sıklıkla çok sayıda antibiyotiğe dirençlidir. *Klebsiella*, amino ve karboksipenisilinlere intrensek dirençlidir. Kromozomal direncin yanında direnç plazmidlerine de sık rastlanır. Birçok suş geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretebilmektedir. Bu oran ise ülkemizde hızla artmaktadır. Bu nedenle çoklu ilaç direncine sahip suşlar ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde birinci kuşak sefalosporinler, penisilin ile beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, florokinolonlar, trimetoprim-sulfametaksazol ve aminoglikozidler kullanılabilir. Çoklu ilaç direncine sahip suşlarda, özellikle GSBL üreten suşların tedavisinde dördüncü kuşak sefalosporinler ve karbapenemler kullanılmaktadır (Topçu, 2002; Lange, 2010).

2.1.3. *Enterobacter*

Enterobacter cinsi son yıllarda özellikle hastane enfeksiyonlarında önemi giderek artan bir bakteri türü olarak karşımıza çıkmaktadır. *Enterobacter* türleri toprakta, suda, bitkilerde, süt ürünlerinde ve ayrıca insan ve hayvanların kalın barsağında ve dışkısında bulunmaktadır (Yazgan, 2010). *Enterobacter* cinsinde bulunan türler *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *E.amnigenus*, *E.cancerogenus*, *E.gergoviae*, *E.intermedium*, *E.taylorae*, *E.agglomerans*, *E.asburiae*, *E.hormaechei*, *E.sakazakii* 'dir. Bu türler arasında insanlardaki enfeksiyonlardan en fazla sorumlu olan türler *E.aerogenes* ve *E.cloacae*'dir.

Besiyerlerinde kolay ürerler. Laktoz içeren besiyerlerinde ortası koyu olan, pembe renkli, konveks, hafif mukoid koloniler oluştururlar.

Enterobacter cinsleri peritriş kirpikleri ile hareketli, sporsuz, çoğu kez kapsülsüz ve kapsüllü olduğu durumda ince kapsüllüdür. Başta glukoz olmak üzere şekerleri asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. İndol ve metil red testi negatifken, Voges Proskauer testi ise çoğunda pozitifdir. H₂S üretmezler ve fenil alanini deamine etmezler. KCN varlığında üreyebilirler. *E. cloacae*'nın ısıya dirençli enterotoksin yapan suşları vardır.

Enterobacter cinsi toplum kökenli enfeksiyonlarda etken olarak karşımıza çıkmasına rağmen bu mikroorganizma ile oluşan enfeksiyonların büyük bir çoğunluğu hastane kaynaklıdır. Özellikle *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* alt solunum yolu enfeksiyonları, cilt ve yumuşak doku enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit, karın içi enfeksiyonları, septik artrit, kemik iliği ve göz enfeksiyonlarını da kapsayan çeşitli enfeksiyonlardan sorumlu nozokomiyal patojenlerdir (Fraser, 2009). Bunlardan *E. cloacae* ve *E. agglomerans*'a ait intravenöz yolla bulaştığı saptanan bakteriyemi salgınları görülmüş ve bazı vakalar ölümle sonuçlanmıştır (Unat, 1986).

Enterobacter enfeksiyonlarında beta-laktamlara, aminoglikozitlere, kinolonlara ve 3. kuşak sefalosporinlere karşı plazmid aracılı direncin ortaya çıkması nedeniyle antibiyotik seçimi tedavi açısından çok önemlidir. Tedavide siprofloksasinle birlikte karbapenemler ya da anti psödomonal penisilinler (mezlosillin, piperasillin, piperasillin/tazobaktam, tikarsillin, tikarsillin/klavulanat gibi) kullanılmaktadır (Kus ve Burrows, 2007,).

2.2. Beta Laktam Antibiyotikler

En sık reçete edilen antibakteriyel ajanlardır. Tüm üyeleri beta-laktam halkası içeren 5 gruptan oluşur: Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar, Karbapenemler, Beta-laktam/Beta-laktamaz inhibitörleri.

2.2.1. Karbapenemler

Karbapenemler 1976'da ilk kez *Streptomyces cattleya* tarafından üretilen ve "thienamycin" ismi verilen bileşiğin üzerinde amino ve hidroksil gruplarında değişiklikler yapılarak oluşturulmuştur (Öncül, 2002). Beta-laktamlar içerisinde en geniş etki spektrumuna sahip olan gruptur. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta-laktam üyelerinden ayrılır. Beta-laktam antibiyotikler gibi peptidoglikan sentezi üzerinde etki gösterir. Mikobakteriler, hücre duvarı bulunmayan organizmalar, bazı nonfermentatifler, *Aeromonas* dışında gram pozitif, gram negatif ve anaerob mikroorganizmalarla oluşan nozokomiyal enfeksiyonlar ve toplumdan kazanılmış olan patojenlere etkilidir. Günümüzde kullanılan karbapenem grubu antibiyotikler imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenemdir.

İmipenem ilk bulunan karbapenem grubu antibiyotiktir. En geniş spektrumlu antibiyotik olup, gram pozitif, gram negatif, aerob ve anaerob mikroorganizmalara etki gösterir (Alhan, 2011). İmipenem monoterapötik özellik gösterir ve klinik olarak önem taşıyan bakterilerin çoğuna etkilidir. Hücre duvar sentezini inhibe eden ve bakterisidal etki gösteren antibiyotiktir. İmipenem gram pozitif ve gram negatif bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı PBP (penisilin bağlayan protein)'lerine yüksek bir afinite göstererek bağlanırlar. Bağlanma önce PBP2'ye ve daha sonra PBP1a'ya olur (Sarı, 2005).

Karbapenem grubunun ikinci üyesi olan meropenem grubu 1996'dan sonra kullanıma girmiştir. Meropenem, karbapenem halkasına 1- β -metil grubu eklenerek elde edilmiştir. Gram pozitif, gram negatif ve anaerob bakterilere karşı etkinlik gösterir. İmipenem gram pozitiflere daha etkilidir, meropenem ise gram negatiflere özellikle de *P.aeruginosa*'ya daha etkilidir (Keskin, 1998; Öncül, 2002).

Ertapenem meropenem gibi 1- β -metil yan zincirine sahiptir. Çok eski geçmişi olmayıp 2001'de yetişkinler, 2005'de ise 3 aydan büyük çocuklar için kullanıma girmiştir (Ahan, 2011). Hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterirler. GSBL ve AmpC enzimlerini üreten *E.coli* ve *K.pneumoniae* bakterilerine karşı güçlü bir etki gösterirler. Metallo-beta-laktamazlara dayanıksızdırlar. Proteinlere yüksek oranda bağlanırlar. Proteine bağlanma oranı ertapenemin plazma konsantrasyonu ile ilişkilidir (Çalangu, 2003; Özmen, 2013).

Doripenem karbapenem grubu antibiyotiklerin en yeni bir üyesidir. 2007'de ABD'de klinik kullanıma girmiştir. PBP'lere bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe ederek etki gösterirler. Doripenemin gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkinliği imipenem ve meropeneme benzer şekildedir (Özmen, 2013).

2.2.2. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları

Karbapenemler antibakteriyel spektrumlarının genişliği, bakteriyel membranlardan hızla geçebilmeleri, AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olma gibi özellikleri nedeniyle özellikle çoklu dirençli Gram-negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonlarda ilk tedavi seçenekleri arasında yer alır. Ancak, karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, karbapenemlere direnç gelişmesine neden olmuştur. Karbapenemlere karşı bilinen 3 etki mekanizması ile direnç gelişebilmektedir.

2.2.2.1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşmaması

Porin değişimleri

Özellikle *P.aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. Bu suşlarda OprD'nin kaybı direnç gelişimine yol açmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişir ve uygulanan 1 haftalık tedavi sonrası suşların yarısının OprD geninde mutasyon gözlenmiştir (Rew, 1989). Bu mekanizma meropenem, penisilin, sefalosporin, kinolon, tetrasiklin ve kloramfenikol için geçerli fakat imipenem için geçersizdir (Kohler, 1999). *P.aeruginosa*'da imipenem direnci porin kaybı ile oluşur ve sadece kromozomal AmpC beta-laktamazı korunduğunda ve tanımlandığında işlev görür. *Enterobacter spp.*'de gelişen imipenem direncinde porin kaybı ve kromozomal AmpC beta-laktamazların çok fazla üretimi tanımlanmıştır (Lee, 1991). *K. pneumoniae*'de gelişen karbapenem direnci porin kaybı ve plazmid aracılığı ile AmpC beta-laktamazın varlığına bağlı olarak gelişir (Bradford, 1997).

Aktif pompalama sistemlerinin indüklenmesi

Gram-negatif bakterilerde dış membranda bulunan enerji bağımlı kanallarla periplazmik alana giren antibiyotiğin dışarı pompalanmasıdır (Farra, 2008). *P.aeruginosa*'da dört tane çoklu ilaç aktif pompa sistemi olan MexA-MexB-OprM, MexC-MexD-OprJ, MexE-MexF-OprN, ve MexX-MexY-OprM tanımlanmıştır. Bu pompaların farklı substrat özgüllükleri mevcuttur. Üretim ve aktiviteleri

enfeksiyonlarda sık görülen faktörlerle arttırılabilirler (örneğin: bakteri inokulumunun yoğun olması, düşük pH ve büyümenin durağan fazı). Yüksek oranda aktif pompa üreten bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisi bilinmemektedir. Fakat antibiyotiklerin farmakolojik olarak optimizasyonu ve farklı pompa sistemleri için substrat olan antibiyotiklerin kombinasyonlarının kullanılması şu an için gerekli görülmektedir (Webber, 2003). *E.coli*'de AcrA-AcrB-TolC, *K.pneumoniae*'da Ram A aktif pompalama sistemine örnektir.

2.2.2.2. Hedef PBP değişimleri

Tek başına nadir görülür, genellikle diğer mekanizmalar ile birlikte. PBP'lerdeki değişiklikler kromozomal mutasyonlara bağlı olarak gelişir. PBP'in beta-laktam antibiyotiklere karşı afinitesinin azalması, sayısında azalma olması ve düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucunda antibiyotiğin hedef hücreye bağlanamaması durumunda direnç gelişmektedir.

2.2.2.3. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı (Beta-laktamazlar)

Bugüne kadar bilinen 600'ün üzerinde farklı beta-laktamaz enzimi bulunmaktadır. Bu enzimlerin bazı özellikleri gözönüne alınarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. 1980'de Ambler beta-laktamazları aminoasit ve nükleotid dizilerine göre moleküler olarak kodlayan sınıflandırma yapmıştır (Rphenfe'd, 1980). 1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından geliştirilmiş olan diğer sınıflandırma ise substrat profilleri ve beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikler esas kriter alınarak yapılmıştır. Tablo 2.2'de beta-laktamazların fonksiyonel ve moleküler sınıflandırması sunulmuştur.

Tablo 2.2. Beta-laktamazların sınıflandırılması

Bush-Jacoby Sınıflaması (fonksiyonel sınıflama)	Temel alt gruplar	Ambler sınıflaması (moleküler sınıflama)	Temel Özellikler
Grup 1 Sefalosporinazlar (klavulanik asit ile inhibe olmaz)	1e	C	Çoğunlukla Gr (-) bakterilerdeki kromozomal enzimler (Amp C) Karbapenem hariç tüm beta -laktamlara dirençli Seftazidime yüksek afinite
Grup 2 Penisilinazlar (klavulanik asit ile inhibe olur)	2a	A	Gram (+) bakterilerdeki penisilinazlar
	2b	A	Çoğunlukla Gr (-) bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1) Ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin direnci
	2be	A	Genişletilmiş spektrumlu (TEM, SHV türevi enzimler, PER-1, CTX-M, VEB-1, GES-1) Ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin direncine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci
	2br	A	Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam dirençli (TEM-30, SHV-10)
	2ber	A	Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam direncine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam dirençli (TEM-50)
	2c	A	Karbenisilini hidrolize eden enzimler (PSE-1, CARB-3)
	2ce	A	Karbenisiline ek olarak, sefepim, sefpirom hidrolize eden enzimler (RTG-4: CARB-10)
	2d	D	Oksasilin ve kloksasilin hidrolize eden enzimler (OXA-1, OXA-10)
	2de	D	Kloksasilin veya oksasilin hidrolizine ek olarak seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci (OXA-11, OXA-15)
	2df	D	Kloksasilin veya oksasilin hidrolizine ek olarak karbapenem hidrolizi (OXA-23, OXA-48, OXA-58)
	2e	A	Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar (CEP A)
	2f	A	Karbapenem, seftazidim, seftriakson, sefotaksim, aztreonam direnci, sefamisin hidrolizi (KPC)
Grup 3 Metallo-beta-laktamazlar	3a	B	Çinko-bağımlı karbapenemazlar Karbapenem hidrolizleri yüksek, monobaktam hidrolizleri zayıf Klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olmazlar Metal iyonu şelatörleri ile inhibe olurlar (IMP, VIM)
NI		Sınıflanmamış	Dizileri bilinmeyen çeşitli enzimler

Karbapenemazlar, karbapenem direnci ile sonuçlanan karbapenem hidrolize edici beta-laktamazlardır. Yalnız karbapenemlere değil diğer antimikrobiyallere de etkilidirler. Bu nedenle sadece karbapenem grubu beta-laktam ajanlara afinitesi diğer beta-laktamlara kıyasla daha fazla olan metalloenzimler “karbapenemaz” olarak adlandırılmaktadır. Diğer beta-laktamazların sayıları ile karşılaştırıldığında sayıları düşük kalmaktadır (Nordman, 2007). Karbapenemazi olan bir suşun ve porin mutasyonlu bir suşun duyarlılık paternleri eş olabilmesine rağmen, bu mekanizma porin mutasyonuna bağlı bozulmuş geçirgenlik mekanizmasından farklıdır.

1990 öncesinde tanımlanan karbapenem hidroliz eden enzimlerin tümü kromozomal olarak bilinmesine rağmen yakın geçmişte Japonya'dan plazmid aracılıklı metallo- β -laktamazlar bildirilmiştir (Nordman, 2007; Amyes, 1997). Karbapenemazlar intrinsik (kromozomal) veya ekstrinsik (kazanılmış) olabilirler.

Kromozomal (Doğal) Karbapenemazlar

Stenotrophomonas maltophilia, *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas sobria*, *Myroides (Flavobacterium) odoratum*, *Chryseobacterium (Flavobacterium) meningosepticum*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii* ve *Bacillus cereus* gibi bakterilerin kromozomları tarafından kodlanırlar. Moleküler sınıflandırmada Ambler Sınıf B'ye ait olan karbapenemazlar bu grup içinde incelenmektedir. Doğal karbapenemazların tümünde çinko iyonlarına bağlı bir katalitik aktivite vardır ve EDTA ile birleştiklerinde bu etkilerini kaybederler (Livermore, 2000).

Kazanılmış Karbapenemazlar

Ambler moleküler Sınıf A, B ve D grubunda bulunan enzimleri içermektedir. Kazanılmış Sınıf A karbapenemazlar birkaç *Entrobacteriaceae* türünde, Sınıf B karbapenemazlar *Acinetobacter spp*, *P. aeruginosa* ve *Entrobacteriaceae* türlerinde, Sınıf D karbapenemazlar ise *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii* gibi bakterilerde görülmektedir.

Enterobacteriaceae ailesinin bazı üyelerinde kromozomal enzimler, bazılarında plazmid aracılı kazanılmış beta-laktamazlar gözlenmektedir. Karbapenemaz aktivitesine sahip olup *Enterobacteriaceae* ailesinde sık görülen beta-laktamaz enzimler Tablo 2.3’de sunulmuştur.

Sınıf A Karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemazların tümü serin beta-laktamaz yapısında olup klavulanik asit ile inhibe olurlar. Bu grup enzimler karbapenem direncinin yanında penisilin ve aztreonam direncine de neden olan enzimlerdir. Bu grupta gram-negatif bakterilerde en sık bulunan TEM, SHV ve CTX-M tipi (karbapenemi hidrolize etmeyen) penisilinaz ve sefalosporinazlara ek olarak karbapenemlere hidrolitik etkinlik gösteren ek beta-laktamazlar mevcuttur (Jacoby, 2005; Walther, 2007). NMC (Not Metalloenzyme Carbapenemase) ve IMI (İmipenem-Hydrolyzing) beta-laktamazlar bu gruba dahildir. SME az sayıda bir grup *S.marcencens* izolatında, IMI ve NMC *Enterobacter* izolatlarında tespit edilmiştir ve bunlar Bush sınıf 2f grubu altında sınıflandırılmış enzimlerdir (Queenan, 2006; Pottumarthy, 2003). Bu grup ayrıca plazmidde kodlanmış olan enzimler KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) ve GES (Guiana Extended Spectrum) enzimlerini içerir. GES *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*’da tanımlanmıştır (Walther, 2007; Yiğit, 2001; Poirel, 2002).

Tablo 2.3. *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenemaz aktivitesine sahip beta-laktamaz enzimler

Moleküler sınıf (fonksiyonel grup)	Gen bölgesi	Enzimler	C L A	E D T A	A T M	Organizmalar
A (2f)	Kromozomal	Sme-I, Sme-3, IMI-I, IMI-3, NmcA, SFC-I,	±	-	R	<i>S.marcescens</i> ve <i>E.cloacae</i>
	Plazmid	KPC-2, KPC-13,	±	-	R	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i>
	Plazmid	GES-I, GES-20	+	-	S/R	<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	-	+	S	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> ve diğer GNNFB
D (2df)	Kromozomal/ Plazmid	OXA-23 grup (OXA-23, OXA-27, OXA-49) OXA-24 grup (OXA-24, OXA25, OXA-26, OXA-40, OXA-72) OXA-40 grup (OXA-40, OXA-143, OXA-58) OXA-48 grup (OXA-48, OXA-54, OXA-181)	±	-	S	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P.aeruginosa</i> , <i>A.baumannii</i>

Klinik olarak en önemli Sınıf A karbapenemaz, 1990'ların sonunda Kuzey Karolina'da *K.pneumoniae*'nin klinik bir izolatında tanımlanmış olan, KPC grubudur (Yiğit, 2001; Lagatolla, 2006; Nordman, 2009). Bundan çok kısa bir süre sonra, Amerika'nın kuzeydoğusunda KPC-2, daha sonra ilk tanımlanan KPC ile aynı olduğu anlaşılan, *K.pneumoniae* ile hastane salgınları bildirilmiştir (Yiğit, 2001; Bratu, 2005; Bradfor, 2004). Takibinde, KPC-3 (KPC-1/KPC-2'den tek bir aminoasit ile farklı olan) taşıyan *K. pneumoniae* ile New York şehrinde bir salgın bildirilmiştir

(Woodfor, 2003). Bu enzimler aktarılabılır bir plazmid üzerinde bulunmaktadır ve tüm beta-laktamlara direnç göstermektedir (Yiğit, 2001).

Sınıf A karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'ların laboratuvar ortamında tespit edilmesi zor olabilir. Üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı ancak imipenem dirençli izolatların elde edilmesi altında yatan SME, NMC veya IMI beta-laktamaz üretimi olasılığını akla getirmelidir (Yiğit, 2001; Pottumarthy, 2003). 2010 yılından önce önerilmiş olan duyarlılık sınırları kullanıldığında, KPC üreten birçok *K.pneumoniae* ve *E.coli* duyarlılık aralığında imipenem ve meropenem MIK değerine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu özellikle otomatize sistemler açısından problem oluşturmaktadır (Tenover, 2006; Anderson, 2007). Bir raporda, KPC üreten *K.pneumoniae* izolatlarının %87'sinin karbapeneme duyarlı olduğu bildirilmiştir (Tenover, 2006).

Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit (3 aminophenyl boronic acid) fenotipik testi, birçok çalışmada önerilmiştir (Patel, 2009; Cohen, 2010). Bu testin KPC pozitif suşların belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Bunun yanında ticari olarak hazır bir şekilde elde edilebilir olmaması ve sonuçların değerlendirilmesi için bir güne daha ihtiyaç duyulması sebebiyle rutin olarak kullanımda tercih edilmemektedir (Endimiani, 2010).

Sınıf B Karbapenemazlar

Klinik olarak en önemli gruptur. Metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak da bilinir. İsmi beta-laktamazın etkin hidrolizi için çinkoya ihtiyaç duymaları sebebiyle almıştır. Bu karbapenemazlar Ambler Sınıf B veya Bush Grup 3'de yer alırlar (Albayrak, 2008). Sonuç olarak MBL'ler tazobaktam, klavulonat ve sulbaktam ile inhibe edilemezken EDTA (iyon şelatörü) ile inhibe edilebilmektedir. İlk MBL, IMP-1; 1991 yılında Japonya'dan bildirilmiştir (Watanabe, 1991). Takibinde,

kazanılmış MBL'lerin ek grupları tespit edilmiştir; IMP, VIM, GIM, SPM ve SIM. Her MBL grubunda birkaç adet varyant mevcuttur (örneğin, IMP grubunda 19 varyant vardır) (Walsh, 2005; Poirel, 2006). *K.pneumoniae*, çoğu geniş spektrumlu serin beta-laktamazın orijinal suşu olmasına rağmen metallo-beta-laktamazların *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer üyeleri arasında yayılımına katkısı olduğu görülmektedir (Gür, 1997).

Hem kromozomal MBL hem de kazanılmış MBL'ler mevcuttur. Kromozomal MBL *Aeromonas hydrophilia*, *Chryseobacterium spp.* ve *Stenotrophomonas maltophilia* türlerinde tespit edilmiştir (Walsh, 2005). Kazanılmış olan MBL'ler türler ve cinsler arasında transfer edilebilen büyük plazmidlerin integronlarında kodlanmış genlerden oluşmaktadır (Hirakata, 1998; Khan, 2003; Houang, 2003; Rossolini, 2005). Bir MBL geninin (*bla_{IMP-4}*) yedi farklı gram-negatif cins arasında (*Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* ve *Enterobacter*) yayıldığı bildirilmiştir (Hirakata, 1998; Peleg, 2005; Herbert, 2007; Hawkey, 2001; Rossolini, 2005; Nordman, 2009).

Yeni bir MBL geni, New Delhi Metallo-beta-laktamaz (NDM-1), taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları ilk olarak 2009 yılında *K.pneumoniae* kaynaklı bir enfeksiyon sebebiyle hospitalize edilmiş bir hastada Hindistan'da tanımlanmıştır (Yong, 2009). Takibinde Pakistan ve Hindistan arasında seyahat eden ve tıbbi prosedür uygulanmış olan hastalarda da bildirilmiştir (Kumarasamy, 2010). Ardından Asya, Avrupa ve Kuzey Amerika'dan da vakalar bildirilmiştir; bu da yayılımın etkin plazmid transferine bağlı olduğunu düşündürmektedir (MMRW, 2010). İzolatlar *E.coli* ve *E.cloacae*'yi de içermektedir (Kumarasamy, 2010). Risk faktörleri; yakın zamanda karbapenem ile tedavi, invaziv üriner ve venöz kateter kullanımı ve ağır hastalık tablosudur (Deshpande, 2010).

Başka bir MBL, Verona integronunda kodlanmış bir MBL (VIM), 2010 yılında karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşu ile enfekte bakteriyemik bir hastada tanımlanmıştır. İzolat *Klebsiella*'yı tedavi etmek için kullanılan birçok antimikrobiyale dirençli bulunmuştur. Dirençli suşa rağmen, hasta 26 gün sonra hastaneden taburcu edilmiştir (MMRW, 2010).

MBL üreten organizmaların laboratuvar olarak tespit edilmesi özellikle zor olabilir; bu izolatların çoğu 2010 yılı öncesi duyarlılık tanımlarına göre karbapenemlere duyarlıdır (Peleg, 2005; Crespo, 2004; Franklin, 2006; Yan, 2001; Scoulica, 2004). Ek olarak, MBL-E testi (ticari olarak bulunabilen bir test) karbapenemlere gerçekten dirençli olan MBL üreten organizmaları tutarlı olarak tespit edememektedir (Walsh, 2005). Bu sebeple, MBL üreten organizmalar karbapenem duyarlılık sonuçlarından bağımsız olarak karbapenem dirençli kabul edilmelidir (Naas, 2005).

Diğer yöntemler çinkoyu şelate eden EDTA'yı kullanarak MBL'lerin çinko bağımlılığının avantajını kullanırlar. İmipenem ve EDTA disklerini veya iki karbapenem diskini (birine EDTA konulmuş şekilde) kullanan kombinasyon disk testleri bildirilmiştir (Lee, 2001; Lee, 2003; Galani, 2008). Ancak, bu metodlar belirgin karbapenem duyarlılığı olan organizmalarda MBL tespiti için her zaman güvenilir değildir (Galani, 2008).

Karbapenemaz aktivitesini gösteren fenotipik yöntemlerden Modifiye Hodge Testi (MHT) uygulanması kolay testtir. Bu testin mekanizması karbapenem antibiyotiğinin test edilen organizma tarafından aktive edilmesi ve zemine yayılmış olan karbapenem duyarlı indikatör suş ile zonun birleşme yerinde üremenin artması sonucunda yonca yaprağı görünümünün elde edilmesidir. Yöntemin karbapenemaz üretimini test etmede duyarlılığı yüksektir. Ancak karbapenemaz enziminin tipini belirleyememektedir (Miriagou, 2010). 2012 yılında CLSI'da suşların karbapenemaz

açısından rutin olarak test edilmesi önerilmemektedir. Enfeksiyon kontrol amacıyla ya da epidemiyolojik açıdan karbapenemaz saptamak için MHT uygulanabilir (CLSI, 2012).

MBL aktivitesinin saptanmasında kullanılan çift disk sinerji testi ve kombine disk testinde yöntem seftadizim disklerinin EDTA, MPA, merkapto asetik asit emdirilmiş disklerle enzimleri erken saptayabilmek için kullanılır (Öcal, 2012; Lee, 2001; Lee, 2004).

MBL genleri (örn; *bla_{VIM}* veya *bla_{IMP}*) için özgül primerlerle PZR amplifikasyonunu kullanan genotipik belirleme MBL üreten organizmalar için kesin bir metoddur (Queenan, 2006; Yan, 2001). Ancak bu metodlar klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmamaktadırlar.

Sınıf D Karbapenemazlar

Oksasilini hidrolize etmeleri sebebiyle OXA-tip enzimler olarak da anılmaktadırlar (Walther, 2006). Bu gruptaki enzimler klavulonat, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerinden değişik oranlarda etkilenmektedirler. OXA karbapenemaz taşıyan klinik izolatlardan çoğunluğu *A.baumannii* suşlarıdır ve bu enzimlere sahip olan *A.baumannii* suşları tüm dünyadan bildirilmiştir (Walther, 2006; Jeon, 2005; Hujer, 2006; Bou, 2005). Heterojen OXA grubu arasında (100'den fazla enzim içeren) farklı derecelerde karbapenem hidrolize eden aktivitelerine göre 4 alt grup tanımlanmıştır; OXA-23, OXA-24, OXA-58 ve OXA-51. İlk 3 grup aktarılabılır plazmidler üzerinde kodlanmıştır, OXA-51 ise kromozomlar üzerinde kodlanmıştır ve *A.baumannii* suşlarında mevcuttur. OXA-23, -24 veya -58 tip karbapenemaz taşıyan *A.baumannii* izolatlarının çoğu karbapenemlere dirençlidir. OXA-23 ve OXA-51'de promoter bölge varlığı (ISAbal) karbapenem direncine katkıda bulunur (Turton, 2006).

OXA-48 karbapenemaz en fazla ülkemizden *K. pneumoniae* ve daha az olarak *E.coli*'de rapor edilmiştir. OXA-48 ilk olarak 2001'de Türkiye'de *K.pneumoniae*'de izole edilmiştir. OXA-48 Türkiye'den sonra Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde, Almanya, Fransa, Belçika, Amerika dahil Batı Avrupa ülkelerinde yayılım göstermiştir.

OXA tipi karbapenemazların laboratuvar ortamında tespiti çok güçtür, OXA tipi karbapenemaz tespitinde klinik laboratuvarlar için uygun olan herhangi bir tarama metodu henüz mevcut değildir. Tarama amacıyla kullanılacak bir PCR metodu geliştirilmiştir (Yan, 2001).

Karbapenemazların tesbit edilmesinde genotipik yöntemler de kullanılmaktadır. Bakteri plazmidlerinin veya kromozomal DNA'nın genotiplendirmesi, fenotiplendirme yöntemlerindeki olumsuzlukları ortadan kaldırıp, epidemiyolojik araştırmalarda daha güvenilir veriler sağlamaktadır. Farklı tipleri belirlemek için kullanılan moleküler yöntemler, DNA dizisindeki farklılıkların belirlenmesi temeline dayanır. Kullanılacak yöntemlerin seçimi için; ayırıcı güç, üstün bir tekrarlanabilirlik özelliği, uygulama ve sonuçları değerlendirmedeki karışıklıkların dikkate alınmasının yanında, maliyet ve laboratuvar yönetiminin uygulanabilmesi de önemlidir. Genotiplendirme yöntemleri fenotiplendirme yöntemlerine göre; tiplendirebilirlik, tekrarlanabilirlik ve ayırıcı güç yönünden daha üstündür. Karbapenemazlar DNA dizi analizi ya da sekanslama yöntemiyle de saptanabilir.

3. MATERYAL ve METOT

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 12.SAĞ.BİL.11 numaralı proje ile destek sağlanarak Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. İzolatların Toplanması

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Ocak 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden izole edilen ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı arşivinde muhafaza edilen 138 *K.pneumoniae*, 47 *Enterobacter spp.* ve 52 *E.coli* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı alınmıştır (B.30.2.AKÜ.0.20.05.04/40).

3.2. Besiyerlerin Hazırlanması

Araştırma kapsamında toplanan *E.coli*, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* suşlarının üretimi rutin kullanımda yer alan Kanlı Agar ve Eozin Metilen Blue (EMB) Agar (Oxoid, England) ile gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi Mueller Hinton Agar, bakterilerin yeniden canlandırılması işlemi sırasında Brain Heart İnfüzyon Buyyon (BHI) (Oxoid, England) kullanılmıştır. İdentifikasyonda Triple Sugar Iron Agar (TSI), Üre Agar ve Simmons Citrate Agar (BioMerieux, France) kullanılmıştır.

Çalışma esnasında kullanılan tüm besiyerleri üretici firma talimatları doğrultusunda Tablo 3.1'de özetlendiği şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan besiyeri karışımı 121°C'de 15 dakika otovlavlanarak (Hiramaya HV-85, Japonya) sterilize

edilmiştir. Sterile edilen agar besiyerleri 50°C'ye kadar soğutulup petrilere dökülmüş, sonra oda sıcaklığında bekletilerek katılaşması sağlanarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışma sırasında kullanılan besiyerleri

Besiyeri	Hazırlanışı
Kanlı agar	21 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır %5 olacak şekilde 50 ml kan eklenmiştir
EMB agar	30 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır
MHA	38 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır
TSI agar	65 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır
Simmons citrate agar	22,3 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır
Üre agar	21 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır
BHI buyyon	37 gr toz besiyeri Distile su eklenerek 1 lt'ye tamamlanmıştır

İdentifikasyon besiyerlerinden TSI ve Simmons Citratase agar sterilizasyon işleminden sonra 8-9 ml cam deney tüplerine dağıtılıp uygun açıda yatık tutularak 2-3 cm dik kısım ve üste yatık kısım oluşacak şekilde uygun açıda yatık tutularak katılaşması sağlanmış ve kullanıma hazır hale getirilmiştir. Üre besiyeri tüplerde 10-12 ml olacak şekilde tüplere dağıtılıp dik şekilde katılaşması sağlanmıştır.

Buyyon besiyerleride üretici firma talimatları doğrultusunda hazırlanmış ve 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildikten sonra steril cam tüplere 3’er ml dağıtılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.3. Suşların İdentifikasyonu

Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı’na gelen örneklerin kanlı ve EMB agara ekimleri yapılmıştır. EMB agarda pembe-kırmızı, metalik röfle yapan, kanlı agarda düzgün 2-3 mm çapında laktoz pozitif *E.coli* olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden, EMB agarda 3-4 mm çapında pembe mukoid, kanlı agarda mukoid 3-4 mm çapında laktoz pozitif *Klebsiella* olduğu düşünülen, EMB agarda pembe, *Klebsiella* kolonileri kadar mukoid olmayan, kanlı agarda düzgün 3-4 mm çapında, laktoz pozitif *Enterobacter* olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden Gram boyama yapılmıştır.

Gram Boyama

Gram boyama, bakterileri hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre iki büyük gruba (gram pozitif, gram negatif) ayırmak için kullanılan ampirik bir yöntemdir. Gram boyama yapmak için hasta numuneleri lama sürülüp kurutulularak hazırlanan preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika bekletilip ve distile su ile yıkanmıştır. Ardından preparata lugol çözeltisi damlatılarak 1 dakika bekletilip, distile su ile yıkanarak lugol çözeltisi uzaklaştırılmıştır. Preparatın üzerine %96’lık etil alkol dökülerek 30 saniye bekletilip, distile su ile yıkanmıştır. Son olarak sulu fuksin damlatılmış ve 30 saniye bekletilip ve preparat distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakılmıştır. Preparata immersiyon yağı damlatılıp, 100’lük objektifle incelenmiştir. Gram negatif bakteriler pembe-kırmızı renkli ve basil şeklinde değerlendirilmiştir. Gram negatif basil olduğu belirlenen kolonilere oksidaz testi yapılmıştır.

Oksidaz testi

Sitokrom oksidaz enzimine sahip olan bakterilerin tanımlanmasında kullanılan bir testtir. Oksidaz negatif olarak saptanan suşlar TSİ besiyerine ekilerek değerlendirme yapılmıştır.

TSİ

TSİ agara iğne öze yardımıyla alınan saf koloni, besiyerinin dik kısmına batırılarak, yatık kısmının yüzeyine de zikzaklar çizilerek ekim yapılmıştır. Sonuçlar 37°C'de bir gün inkübasyonda bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. TSİ besiyeri ile bakterilerin glukoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkileri ve H₂S oluşturup oluşturmadıkları saptanmıştır.

Simmons Citrate

Citrate agara iğne öze yardımıyla alınan saf koloni, besiyerinin dik kısmına batırılarak, yatık kısmının yüzeyine de zikzaklar çizilerek ekim yapılmıştır. Sonuçlar 37°C'de bir gün inkübasyonda bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Bu besiyeri gram negatif bakterilerin karbon kaynağı olarak sitrattan yararlanıp yararlanmadıklarını ortaya çıkarmak için kullanılmıştır.

Üre Agar

Üre agara iğne öze yardımıyla alınan saf koloni, besiyerine batırılarak, ekim yapılmıştır. Sonuçlar 37°C'de bir gün inkübasyonda bekletildikten sonra değerlendirilmiştir. Bu test, mikroorganizmaların üreyi hidrolize eden üreaz enzimini saptamak amacıyla yapılmıştır.

Indol Testi

Bu test, mikroorganizmaların bir aminoasit olan triptofanı ayrıştırarak indol meydana getirebilme yeteneğini belirlemek için kullanılmıştır. Mikroorganizmalar sıvı besiyerine veya peptonlu sıvıya ekildikten sonra 37°C de 1-5 gün inkübasyona bırakılmıştır. Kültürlerin üzerine Kovacs (veya Ehrlich) ayırıcından 0,5 ml ilave edilip ve iyice karıştırılmıştır (Ehrlich ayıracı kullanılacaksa öncesinden 1 ml ksilen eklenir). Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde menekşe rengi halkanın oluşması pozitif reaksiyon (indol formasyonunu) değerlendirilmiştir.

Metil Red Testi

Bu test, glukozun fermentatif metabolize olması sonucu besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'nın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Üremiş kültürlerden, besiyerlerine (tüpte hazırlanmış Clark Lubs besiyeri) bakteri inoküle edilmiş ve tüpler 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Üzerine metil kırmızısı solüsyonundan 4-5 damla damlatılıp karıştırılmıştır. Metil-red, besiyerine damlatıldıktan sonra üstte kırmızı renkli bir halkanın meydana gelişi pozitif metil-red testi olarak kabul edilmiştir.

Voges Proskauer Testi

Bu testi uygulamak için metil red testinin yapılmış olması gerekmektedir. Bu test, bazı mikroorganizmaların glukozu fermente ederek, nötral bir ürün olan acetylmethylcarbinol'u (acetoin) meydana getirme yeteneğini tayin etmek için kullanılır. İçinde glukoz bulunan bufferlı MR/VP (Clark-Lubs, pH 6,9,5 ml) besiyerine bakteri inoküle edilmiş ve 37°C'de 2-7 gün inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda kültürlere ve ekilmemiş tüplere O'Meara ayırıcından (VP ayıracı) 1 ml ilave edilip hafifçe çalkalanmıştır. Su banyosunda (37°C'de) 4 saat tutulmuş ve

aralıklı olarak hafifçe çalkalanmıştır. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe rengin oluşu, acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilmiştir.

Tablo 3.2. *E.coli*, *K.pneumoniae*, *Enterobacter spp.* izolatlarının metabolik reaksiyonları

	Indol	Metil-Red	Voges Proskauer	Sitrat	Üre	TSİ			
						Gaz	H ₂ S	Dip	Yatık
<i>E.coli</i>	+	+	-	-	-	D	-	Asit(S)	Asit(S), Alkali(K)
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+	-	Asit(S)	Asit(S), Alkali(K)
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	D	+	-	Asit(S)	Asit(S)

Oksidaz aktivitesi, glukoz ve laktoz fermentasyonu, fermentasyon esnasında gaz oluşumu gibi biyokimyasal reaksiyonlarına göre *Enterobacteriaceae* olarak değerlendirilen suşlar otomatize sistem Phonex (Becton Dickinson, USA) ile tür düzeyinde tanımlanmıştır.

3.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

İzole edilen bakterilerin tümünün konvansiyonel yöntemle antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi MHA (Oxoid, İngiltere) ve standart antibiyotik diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanılarak CLSI M02-A11'e (CLSI, 2012) göre Kirby Bauer disk

difüzyon yöntemiyle yapılmıştır. İnkübasyon sonrası sonuçlar CLSI M100-S22'ye (CLSI, 2012) göre “duyarlı”, “orta duyarlı” ve dirençli” olarak yorumlanmıştır.

Duyarlılıkları disk difüzyon metodu ile incelenen antibiyotik diskleri (Oxoid, England); AMP (Ampisilin-10µg), AMC (Amoksisilin/klavulanik asit-30µg), TZP (Tazobaktam-piperasilin-110µg), CAZ (Seftazidim-30µg), CTX (Sefotaksim-30µg), CRO (Seftriakson-30µg), IPM (İmipenem-10µg), MEM (Meropenem-10µg), ETP (Ertapenem-10µg), CN (Gentamisin-10µg), AK (Amikasin-30µg), TOB (Tobramisin-10µg), CİP (Siprofloksasin-5µg), LEV (Levofloksasin-5 µg), FEP (Sefepim-30µg) kullanılmıştır.

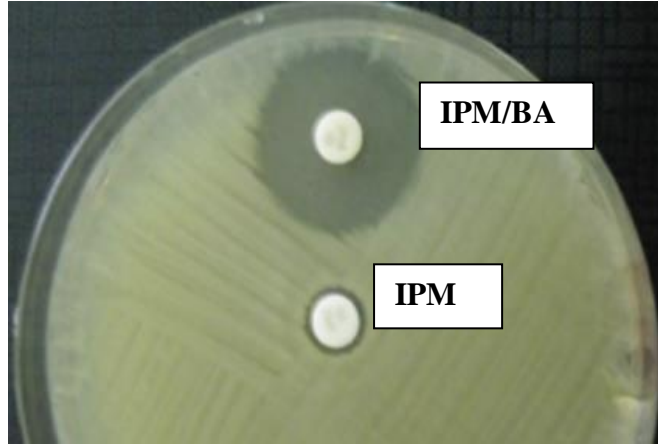
24 saatlik taze kültürlerden bakteri suşlarının yoğunluğu 0,5 McFarland bulanıklık sağlayacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Bu süspansiyon steril eküvyon çubuk ile 4 mm kalınlığında dökülmüş MHA yüzeyine homojen olacak şekilde ekim yapılmıştır. Besiyeri yüzeyi kuruduktan sonra antibiyotik diskleri dispenser (Oxoid, England) ile birbirine uzaklıkları 25'er mm olacak şekilde yerleştirilmiştir. Petriler 24 saat 37°C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında her antibiyotik için inhibisyon zon çapları milimetrik olarak ölçülmüştür. Sonuçlar CLSI'nın önerdiği kriterlere uygun olarak değerlendirilmiştir.

3.5. Karbapenemazların Fenotipik Yöntemle Araştırılması

Tür düzeyinde tanımlanarak antibiyotik duyarlılık testi gerçekleştirilen suşlar kriyobank saklama besiyerine (AES Chemunex Cryo-billes, France) çekilerek -80°C derin dondurucuda arşivlenmiştir. Çalışma esnasında arşivden çıkarılan suşlar BHI agara inokule edilerek yeniden canlandırılmıştır. Canlandırılan suşlar karbapenemaz enzimleri açısından fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

Boronik Asit Testi

3 ml dimetil-sülfoksit içerisinde 120 mg benzenboronik asit çözüldükten sonra üzerine 3 ml distile su eklenerek stok solüsyon hazırlanmıştır. Solüsyondan 20 µl alınmış ve diskteki miktarın 400µg boronik asit olacak şekilde imipenem diskinde emdirilmiştir. Diskler oda ısısında 30 dakika kurutulup steril bir tüp içerisinde derin dondurucuya kaldırılmıştır. CLSI'nin önerileri dikkate alınarak izolatlar tarama testi olarak kullanılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile MHA kullanılarak yapılmıştır. Ekimi yapılmış plaklar 37°C'de bir gecelik inkübasyona bırakılmıştır. Tüm testlerde kontrol için ATCC 25922 *E.coli*, ATCC 700603 *K.pneumoniae* standart suşlar kullanılmıştır. CLSI doğrultusunda imipenem diski zon içi üreme gösteren suşlar KPC-tipi karbapenemaz üretimi yönünden pozitif değerlendirilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Karbapenemaz üreten bir bakteriye ait boronik asit testi

MBL E Test

Çalışmaya alınan *Enterobacteriaceae* izolatlarına uygulanan E-test yönteminde, bakteri izolatlarının taze kültürlerinden 0,5 Mc Farland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril bir eküvyonla MHA üzerine bakterinin homojen

inokülasyonu yapılmıştır. Besiyeri yüzeyinin kurumasının ardından bir tarafında azalan konsantrasyonlarda IPM'e ek, diğer tarafında sabit konsantrasyonda EDTA içeren E-test şeritleri besiyeri üzerine yerleştirilmiş ve plaklar 37°C'da 24 saat inkübe edilmiştir.

İmipenem+EDTA MİK değeri ile imipenem MİK değeri arasında en az sekiz kat azalma saptanırsa, test metallo beta laktamaz enzimi açısından pozitif kabul edilmiştir. Testin pozitif olmasının diğer bir kriteri, E-test şeritinin imipenem veya EDTA içermeyen orta bölümünde "ghost zone" (hayalet bölge) olarak adlandırılan görüntünün izlenmesi olarak değerlendirilmiştir

Modifiye Hodge Testi (MHT)

Test için 0.5 McFarland standardına uygun olarak hazırlanan *E.coli* ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Muller Hinton buyyonda seyreltikten sonra MHA plağına ekilmiştir. Ertapenem diski plak merkezine yerleştirilip bir öze veya eküvyon yardımı ile 18-24 saatlik inkübasyon sonucu kültürlerden üretilmiş olan bakteri kolonilerinden alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20–25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilmiş ve plaklar 37°C etüvde 18-24 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. MHA plağında, test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışı değerlendirilmiş ve üremede artış varlığında karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir

3.6. Karbapenemazların Genotipik Yöntemle Araştırılması

Öncelikle elde edilen izolatların DNA izolasyonu gerçekleştirilmiş, İnhouse PZR ile optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra moleküler çalışmalar gerçekleştirilmiştir.

3.6.1. Bakteriyel DNA'nın ekstraksiyonu

DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, çalışmaya başlamadan bir gün önce suşların tümü -80°C 'den çıkarılmış, BHI buyyonda bir gece inkübe edilerek yeniden canlandırılmış ve kanlı agara subkültürleri yapılmıştır.

Her bakteri suşu için, steril eppendorf tüplere 100 μL lizis tamponu koyularak, steril öze ile her petriden 2-3 koloni alınıp lizis tamponu içerisinde iyice çözünmesi sağlanmıştır. Kaynamış 100°C 'lik saf suda 15 dakika kaynatılarak oda sıcaklığında soğuması için beklenmiş ve tüpler soğuyunca santrifüjde 14000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonrası süpernatantın 30 μL 'si alınıp PZR işlemi için ayrılmıştır.

3.6.2. Primerlerin Hazırlanışı

Gen bölgelerinin amplifikasyonu için altı ayrı primer seti kullanılarak çalışılmıştır. Hedeflenen DNA dizilimleri Gen bankası verilerinden bulunmuştur. Seçilecek primerlerin belirlenen hedef DNA'ya özgün olup olmadığını saptamak için Primer3 Plus programı kullanılmıştır. OXA-48, OXA-58, NDM, VIM, IMP, KPC için yaklaşık olarak 20-30 basepare (bp) uzunluğunda Forward ve Reverse primerler belirlenmiştir. Primer dizilerinin uygunluğu diğer yayınlarla desteklenerek literatür taranmış ve primer dizaynına karar verilmiştir. Liyofilize halde bulunan primerlerin (ThermoScientific, ABD) sulandırma işlemi üretici firma talimatları doğrultusunda protokole uygun olarak yapılmış ve 100 pmol/ μL konsantrasyonda stok primerler elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılacak primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/ μL olarak planlanmıştır. Bunun için 100 pmol/ μL konsantrasyonda stok primerden 10 μL alınarak 90 μL distile su ile toplam hacim 100 μL olacak şekilde tekrar sulandırılmış, eppendorflara ayrılıp -20°C 'de muhafaza edilmiştir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Karbapenem direncini kodlayan genlerin araştırılmasında kullanılan primerler

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün uzunluğu (bp*)	Referans	Genbank erişim no
OXA48-F	TTGGTGGCATCG ATTATCGG	744	Queenan, 2007	AY236073
OXA48-R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC			
OXA58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	599	Gao, 2013	JX968506
OXA58-R	CCC CTCTGCGCTCTACATAC			
VIM-F	ATTGGTCTATTTGACCGCGTC	380	Yum, 2002	DQ489717
VIM-R	TGCTACTCAAGGACTGAGCG			
IMP-F	CATGGTTTGGTGGTTCTTGT	188	Yum, 2002	JQ002629
IMP-R	ATAATTTGGCGGACTTTGGC			
KPC-F	TGTCACTGTATCGCCGTC	331	Mosca, 2013	JX430448
KPC-R	TATTTTTCCGAGATGGGTGAC			
NDM-F	CAATATTATGCACCCGGTCCG	726	Kaase, 2012	KC539432
NDM-R	ATCATGCTGGCCTTGGGGAA			

3.6.3. PZR Optimizasyonu

PZR çalışmalarında kullanılacak primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için inhouse PZR ile farklı sıcaklıklarda optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Primerlerin bağlanma ısıları $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ formülü ile hesaplanmıştır. Çalışmada OXA-48, OXA-58, IMP, VIM, KPC, NDM gen bölgelerinin gösterilmesi için altı ayrı primer seti kullanılmıştır. Toplam volem 25 µl olacak şekilde reaksiyon mixi hazırlanarak İnhouse PZR ile optimizasyonu takiben ilgili gen bölgelerini saptamaya yönelik moleküler çalışmalar yapılmış ve pozitif bulunan örnekler agaroz jel elektroforez yöntemi ile görüntülenmiştir. Çalışmada kullanılan PZR reaksiyon mixi Tablo 3.4'de verilmiştir.

Tablo 3.4. PZR reaksiyon karışımı

CYBR (marka)	12,5µl
Primer Forward	1 µl
Primer Reverse	1 µl
DNase Free Water	9,5 µl
DNA	1 µl
Toplam	25 µl

3.6.4. İzolatların Moleküler Olarak Doğrulanması

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarının moleküler olarak tanımlanması için 23S RNA gen bölgesi çoğaltılmıştır. Bunun için F 5' CGG AGG AGG CTA GGG CCG 3' ve R 5' GAC CGC CCC AGT CAA ACT GCC 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 450 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.5'da verilmiştir.

Tablo 3.5. 23S RNA gen bölgesi PZR protokolü

95°C	7 dakika	1 siklus
95°C	30 saniye	35 siklus
54°C	30 saniye	
72°C	20 saniye	
72°C	1 dakika	1 siklus

3.6.5. PZR ile OXA-48 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarında OXA gen bölgesinin belirlenmesi için OXA-48 F 5' TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG 3' ve R 5' GAG CAC TTC TTT TGT GAT GGC 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon

işlemi gerçekleştirilmiştir ve 744 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.6’de verilmiştir.

Tablo 3.6. OXA-48 gen bölgesi PZR protokolü

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	1 dakika	30 siklus
53°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.6.6. PZR ile OXA-58 Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarında OXA gen bölgesinin belirlenmesi için OXA-58 F 5’AAG TAT TGG GGC TTG TGC TG 3’ ve R 5’ CCC CTC TGC GCT CTA CAT AC 3’ primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 599 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.7’de verilmiştir.

Tablo 3.7. OXA-58 gen bölgesi PZR protokolü

92°C	6 dakika	1 siklus
92°C	1 dakika	40 siklus
51.5°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.6.7. PZR ile NDM Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarında NDM gen bölgesinin belirlenmesi için F 5' CAA TAT TAT GCA CCC GGT CG 3' ve R 5' ATC ATG CTG GCC TTG GGG AA 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 726 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.8'da verilmiştir.

Tablo 3.8. NDM gen bölgesi PZR protokolü

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	30 saniye	35 siklus
56°C	30 saniye	
72°C	20 saniye	
72°C	1 dakika	1 siklus

3.6.8. PZR ile VIM Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinden sorumlu metallo beta laktamaz enzimi olan VIM gen bölgesinin belirlenmesi için VIM F 5' ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC 3' ve R 5' TGC TAC TCA AGG ACT GAG CG 3' primerleri kullanılmış, PZR sonucu 380 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.9'da verilmiştir.

Tablo 3.9. VIM gen bölgesi PZR protokolü

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	30 saniye	35 siklus
56°C	30 saniye	
72°C	20 saniye	
72°C	1 dakika	1 siklus

3.6.9. PZR ile IMP Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp* ve *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenem direncinden sorumlu metallo beta laktamaz enzimi olan IMP gen bölgesinin belirlenmesi için 5' CAT GGT TTG GTG GTT CTT GT 3' ve R 5' ATA ATT TGG CGG ACT TTG GC 3' primerleri kullanılmıştır. IMP için 188 bp büyüklüğünde PZR ürünleri elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.10'de verilmiştir.

Tablo 3.10. IMP gen bölgesi PZR protokolü

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	1 dakika	35 siklus
53°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	10 dakika	1 siklus

3.6.10. PZR ile KPC Gen Bölgesinin Amplifikasyonu

E.coli, *Enterobacter spp.* ve *K.pneumoniae* izolatlarında KPC gen bölgesinin belirlenmesi için F 5' TGT CAC TGT ATC GCC GTC 3' ve R 5' TAT TTT TCC GAG ATG GGT GAC 3' primerleri kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir ve 331 bp büyüklüğünde PZR ürünü elde edilmiştir. PZR çalışmasında kullanılan sıcaklık döngüleri Tablo 3.11'de verilmiştir.

Tablo 3.11. KPC gen bölgesi PZR protokolü

94°C	4 dakika	1 siklus
94°C	1 dakika	35 siklus
55°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	5 dakika	1 siklus

3.6.11. Agaroz-Jel Elektroforez

PZR çalışmaları sonucunda oluşan ürünler agaroz jel elektroforezde incelenmiştir. Bunun için % 2'lik agaroz jel kullanılmıştır. % 2'lik jel yapmak için 1g agaroz tartılıp 50mL 1X TBE (Tris-Borik-Asit-EDTA) içerisinde çözülerek mikrodalga fırında yaklaşık 3-5 dakika kaynatılmıştır. Biraz soğuması beklenirken yatay jel elektroforez tablasının içine yükleme kuyucuklarını oluşturacak şekilde taraklar düzgün bir şekilde yerleştirilmiştir.

Sıvı halde bulunan karışım jel tablasının içerisine yavaşça, kabarcık oluşturmayacak şekilde dökülmüş ve 25-30 dakika oda sıcaklığında katılaşmaya bırakılmıştır.

Katılaştıran jel içerisinden taraklar çıkarılmış ve jel, içerisinde 250 mL 1X TBE tampon konulan elektroforez tankının (Thermo minicell EC 320 Electrophoretic Gel System, ABD) içerisine yerleştirilmiştir. Çoğaltılan PZR ürünlerinden 10'ar µl alınıp üzerlerine 2µl yükleme solüsyonu eklenip karıştırılmıştır. Bu karışımdan 10 µl alınıp katılaşmış halde bulunan jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir. Jele marker ve örneklerin yüklemesi yapıldıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatılarak, güç kaynağına bağlanmış ve 100 Volt şiddetinde akım 1 saat boyunca yürütülmüştür. Süre sonunda jel dikkatli bir şekilde, içerisinde Etidyum Bromür (Sigma, ABD) bulunan, ışık geçirmeyen ağzı kapalı kabın içerisinde 15 dakika boyanmaya bırakılmıştır. Boyanan jel transluminatör cihazındaki (Herolab UVT-20M, Almanya) uygun odacığa

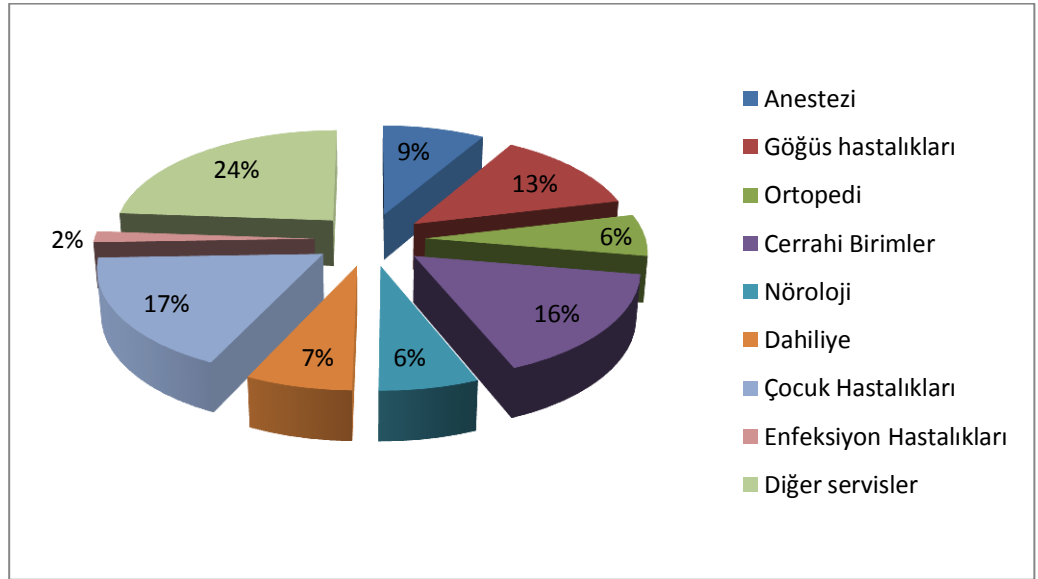
yerleştirilerek ultraviyole ışık altında incelenmiştir. PZR sonucu oluşan ürünler, marker (ThermoScientific, 1kb ladder) ile karşılaştırılarak incelenmiştir. Yaklaşık olarak 744 bp'lik bant oluşumu OXA-48, 599 bp'lik bant oluşumu OXA-58, 380 bp'lik bant oluşumu VIM, 188 bp'lik bant IMP, 331 bp'lik bant KPC, 726 bp'lik bant NDM gen bölgesinin varlığını göstermiştir.

4. BULGULAR

Toplam 237 *Enterobacteriaceae* ailesine ait 138 *K.pneumoniae*, 52 *E.coli* ve 47 *Enterobacter spp.* (19 *Enterobacter aerogenes*, 28 *Enterobacter cloacae*) suşu çalışmaya dahil edilmiş ve aynı hastadan ikinci kez izole edilen suşlar çalışma kapsamına alınmamıştır. İzolatların 128'i (%54) erkek hastalardan, 109'u (%46) kadın hastalardan izole edilmiştir.

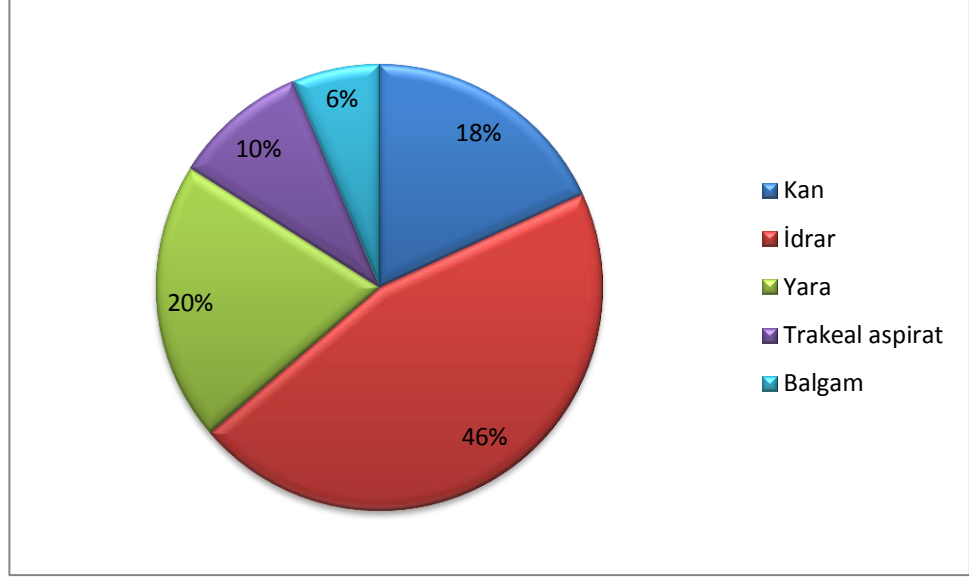
İzolatların %75,1'i yatarak tedavi gören hastalardan, %24,9'u polikliniğe başvuran hastalardan izole edilmiştir.

İzolatların kliniklere göre dağılımına bakıldığında ise; %53,6'sının pediatri kliniği başta olmak üzere dahiliye ve göğüs hastalıkları gibi dahili birimlerden, %46,4'ünün anestezi yoğun bakım ünitesi ağırlıklı olmak üzere cerrahi birimlerden gönderilen örnekler ait olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Örneklerin kliniklere göre dağılımı

Suşların izole edildiği örneklerin dağılımına bakıldığında %45,6 idrar, %20,2 yara, %18,2 kan, %9,7 trakeal aspirat, %6,3 balgam olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Suşların izole edildiği örneklere göre dağılımı

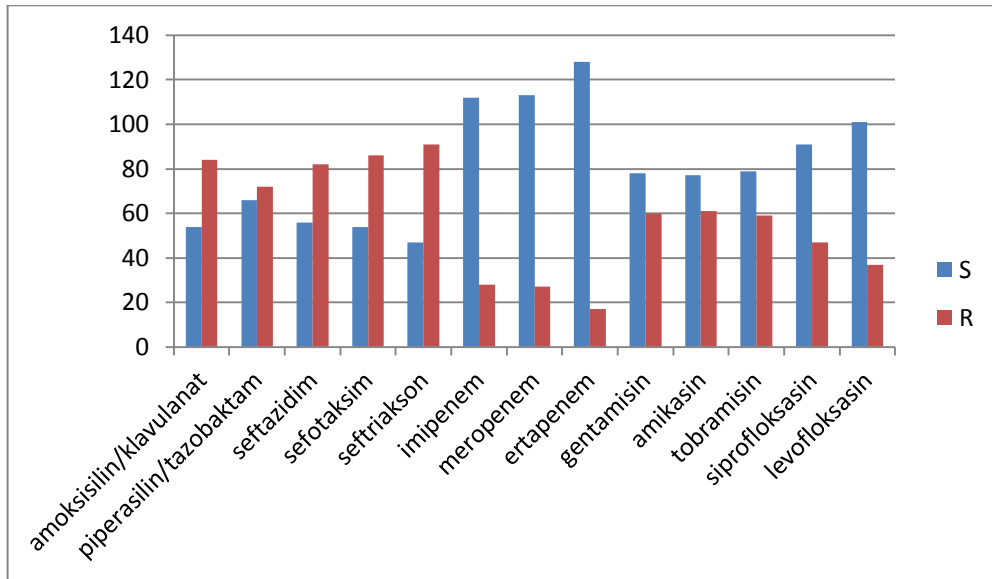
K. pneumoniae suşlarının %46,3'ü ve *E. coli* suşlarının %24,6'sı idrar örneklerinden, *Enterobacter spp.* suşlarının ise %51,1'i yara örneklerinden izole edilmiştir. Her 3 bakterinin izole edildiği örnek ve kliniklere göre dağılımı Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Konvansiyonel yöntemlerle tanımlanan 52 *E.coli* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemi ile, otomatize sistemle tanımlanan 138 *K. pneumoniae*, 19 *E.aerogenes*, 28 *E.cloacae* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri otomatize sistemle gerçekleştirilmiş ve CLSI önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir.

K.pneumoniae izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde, karbapenemlerden sonra en etkili antibiyotiklerin %26,9 oranı ile levofloksasin, %34,7 oranı ile siprofloksasin olduğu gözlenmiş ve %65,9 oranıyla seftriakson, %60,9 oranıyla sefotaksim ve amoksisilin/klavulanatın en dirençli antibiyotikler olduğu saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının %51,4'de GSBL gözlenmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik direnç paterni Şekil 4.3'de sunulmuştur.

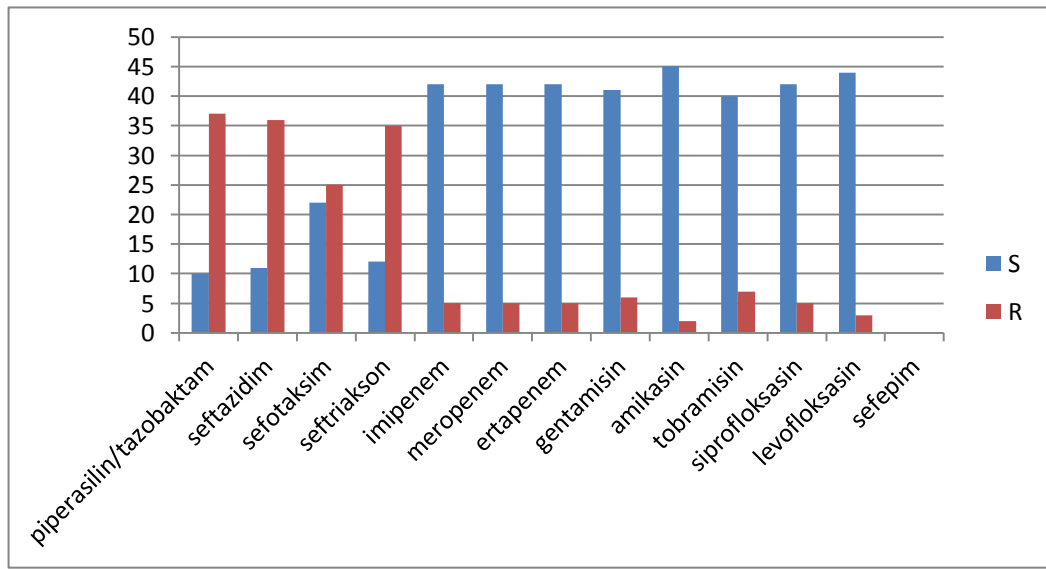
Tablo 4.1. Bakteri türlerinin klinik/poliklinik ve izole edilen materyallere göre dağılımı

Gönderilen Klinik Materyaller	<i>K.pneumoniae</i>		<i>E.coli</i>		<i>Enterobacter spp.</i>		TOPLAM
	Yatan hasta	Poliklinik hastası	Yatan hasta	Poliklinik hastası	Yatan hasta	Poliklinik hastası	
İdrar	38	26	12	22	5	5	108
Kan	31	-	5	-	7	-	43
Yara	11	6	5	2	17	7	48
Trakeal aspirat	18	-	1	-	4	-	23
Balgam	8	-	5	-	2	-	15
TOPLAM	106	32	28	24	35	12	237



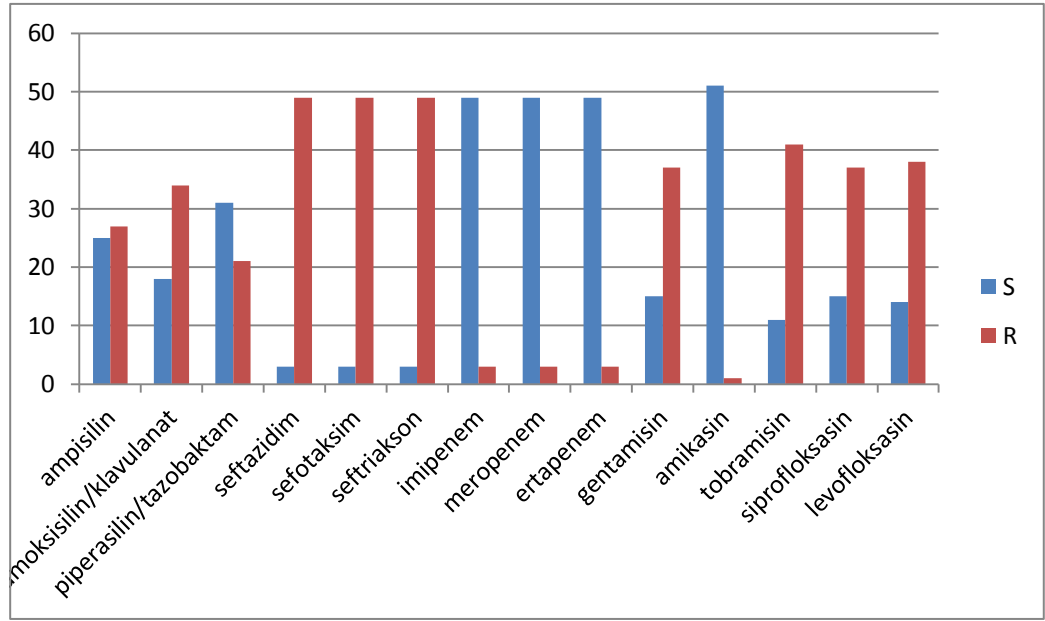
Şekil 4.3. *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

Enterobacter spp. izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde en etkili antibiyotiğin amikasin (%4,2), levofloksasin (%6,3) ve siprofloksasin (%10,7) olduğu gözlenmiştir. En dirençli antibiyotiklerin ise %78,8 oranında piperasilin/tazobaktam ve %76,6 seftazidim olduğu gözlenmiştir. *Enterobacter spp.* izolatlarının %30,4'ünde İndüklenebilir beta-laktamaz (IBL) varlığı saptanmıştır. *Enterobacter spp.* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları şekil 4.4'de sunulmuştur.



Şekil 4.4. *Enterobacter spp.* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

E. coli izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları incelendiğinde, en etkili antibiyotiğin %1,9 oranıyla amikasin olduğu gözlenirken, %5,7 direnç oranıyla imipenem, meropenem ve ertapenem olmak üzere karbapenem grubu antibiyotiklerin de bunu takip ettiği gözlenmiştir. Sefalosporin grubu antibiyotiklerden seftazidim, seftriakson, sefotaksime direnç oranı %92,3 olarak gözlenmiştir *E. coli* suşlarının %92,3'ünde GSBL saptanmıştır. *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç paterni Şekil 4.5'de gösterilmiştir.

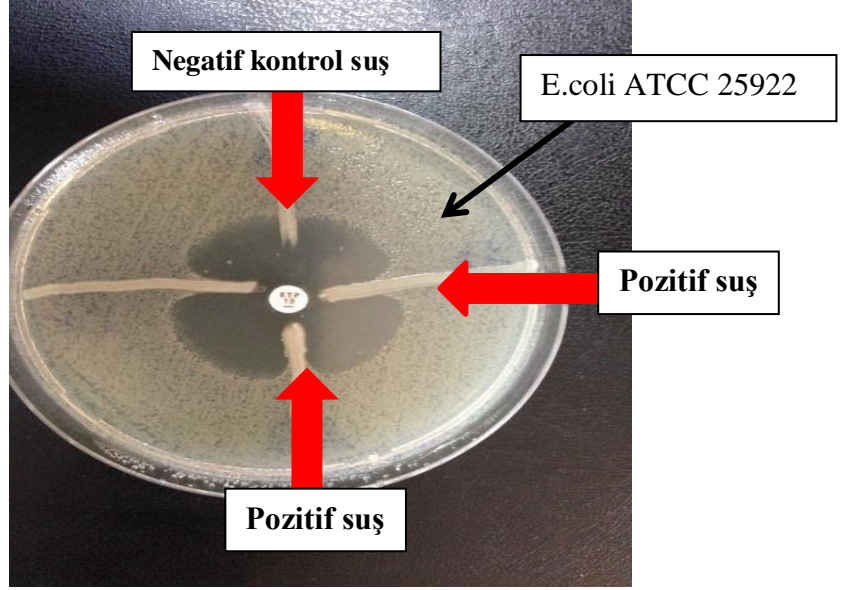


Şekil 4.5. *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık profilleri

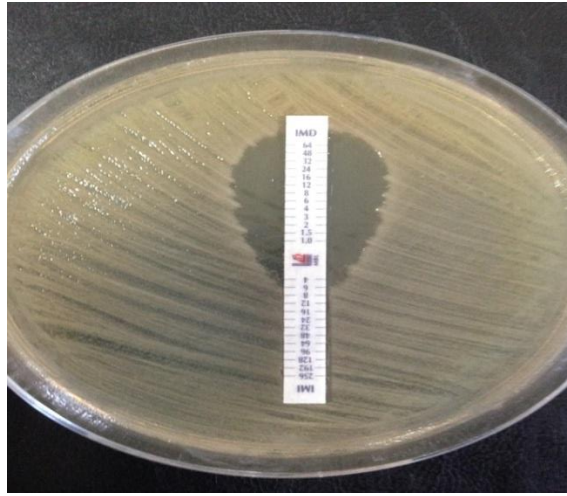
K. pneumoniae suşlarının %23,9'unda, *E. coli* suşlarının %13,5'inde, *Enterobacter spp.* suşlarının %12,8'inde ertapenem, imipenem ve meropenemden en az birine direnç ya da azalmış duyarlılık gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm suşlarda karbapenemlere direnç oranı %19,4 olarak tespit edilmiştir.

Karbapenemlerden en azbirine direnç ya da azalmış duyarlılık saptanan toplam 46 izolatın (33 *K. pneumoniae*, 7 *E. coli*, 6 *Enterobacter spp.*) %89,1'inde karbapenemaz kodlayan gen bölgelerinden en az biri saptanmıştır.

Çalışmamızda Grup A karbapenemazların fenotipik olarak saptanmasında kullanılan yöntemlerden biri olan boronik asit testi ile suşların hiçbirinde KPC türü karbapenemaz üretimi gözlenmemiştir. MBL'in fenotipik saptanmasında kullandığımız MHT ile %8,1 (n=19) izolat, MBL E test ile %10,1 (n=24) izolat pozitif saptanmıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. MHT pozitif olan izolatların görünümü



Şekil 4.7. Karbapenemaz üreten bir bakteriye ait MBL E-test

K.pneumoniae suşlarının %11,5 (n=16)'sında MHT pozitif, %15,2 (n=21)'de MBL E test pozitif olduğu saptanmıştır. *K.pneumoniae* suşlarının 6'sında MHT ile karbapenemaz üretimi negatif bulunurken, MBL E test ile pozitif saptanmıştır. Bir izolatta MHT pozitif iken, MBL E test ile karbapenemaz üretimi tespit edilmemiştir.

Genotipik olarak MBL ürettiği saptanan 4 suşta ise MBL E test ve MHT ile karbapenemaz varlığı gösterilememiştir.

Tablo 4.2. Karbapenemaz ürettiği genotipik olarak saptanan izolatların fenotipik yöntem sonuçları

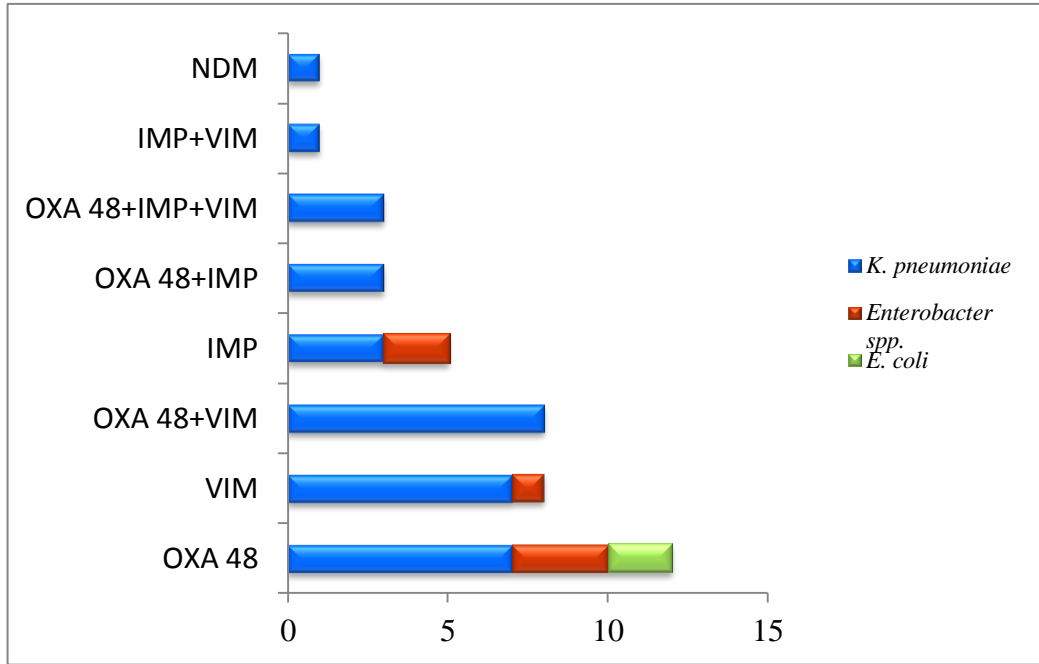
MBL (+) (n=24)	E-test	MHT(+)	MHT(-)
<i>K.pneumoniae</i> (n=21)	(+)	15	6
	(-)	1	4
<i>Enterobacter spp.</i> (n=3)	(+)	3	-
	(-)	-	-
TOPLAM		19	10

Çalışmamızda kültürü yapılan bakteriyel örneklerin nükleik asit izolasyonu lizis buffer kullanılarak yapılmıştır. Optimizasyon çalışmaları ise konvansiyonel PZR ile OXA-48, OXA-58, VIM, IMP, NDM, KPC gen bölgeleri için yapılmıştır. Gen bölgeleri için en uygun bağlanma sıcaklığı gradiyent uygulanmak koşuluyla optimize edilmiş ve OXA-48, OXA-58, VIM, IMP, NDM, KPC için sırasıyla 53°C, 51,5°C, 53°C, 53°C, 54°C, 55°C ilgili primerlerin bağlanabilmesi için en uygun sıcaklık olarak saptanmıştır. Uygun bağlanma sıcaklıkları belirlendikten sonra ekstrakte edilen tüm izolatlar PZR yöntemi ile amplifiye edilmiş ve elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir.

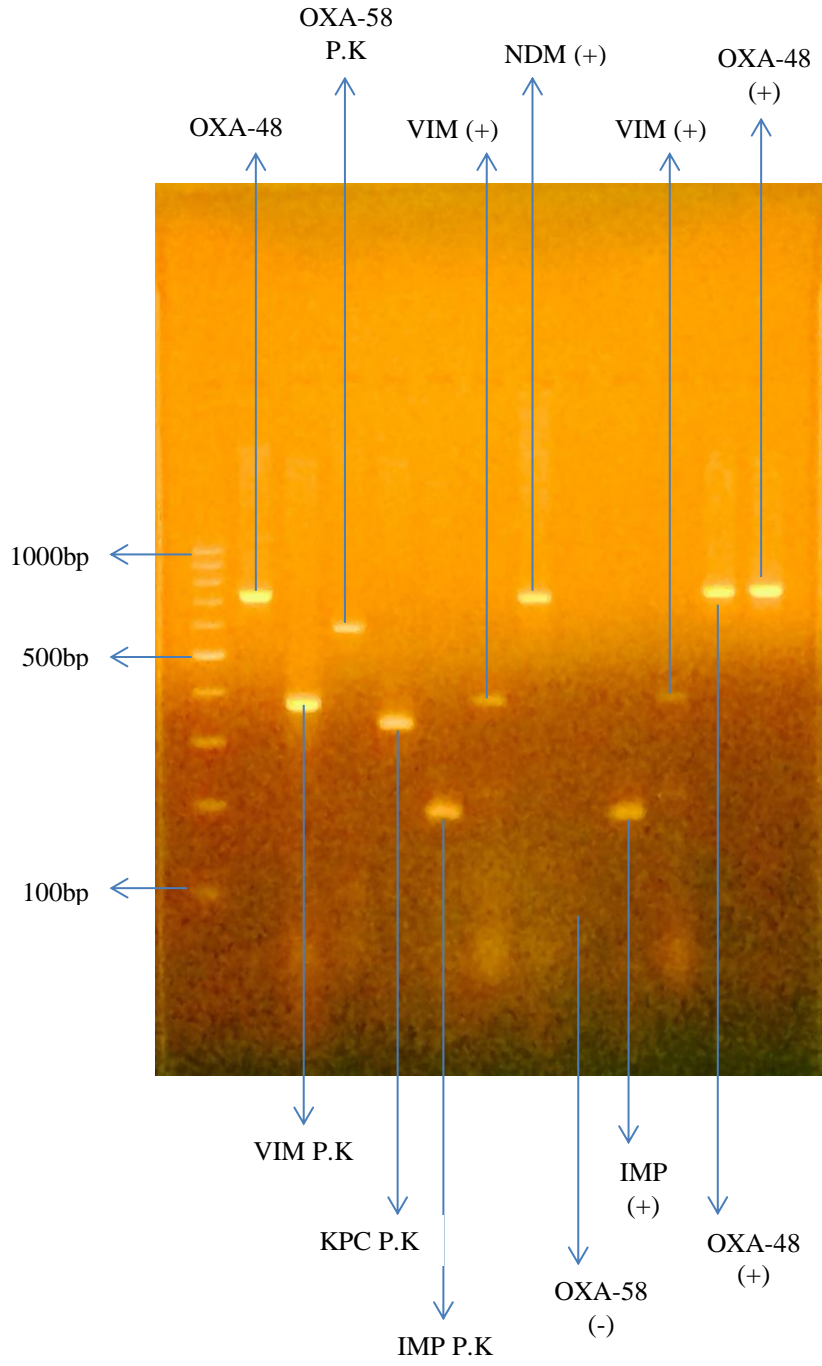
K.pneumoniae, *E.coli*, *Enterobacter spp.* suşlarında OXA-58 ve KPC primerleri kullanılarak gerçekleştirilen PZR reaksiyonu ile OXA-58 ve KPC enzimlerinin varlığı araştırılmış ve suşların hiçbirinde OXA-58 ve KPC gen bölgesinin varlığı saptanmamıştır.

PZR yöntemi ile karbapenemaz gen varlığı araştırılan toplam 237 suşun %11'inde *bla*OXA-48 (21 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, 3 *Enterobacter spp.*), %8,9'unda *bla*VIM (19 *K. pneumoniae*, 2 *Enterobacter spp.*), %4,6'sında *bla*IMP (10 *K. pneumoniae*, 1 *Enterobacter spp.*), 1 *K. pneumoniae* suşunda *bla*NDM-1 geni saptanmıştır.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının 21'inde OXA-48 pozitif, 19'unda VIM pozitif, 10'unda IMP ve 1 izolatta NDM-1 geni tespit edilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarının %54,5'inde tek gen varlığı, %45,5'inde iki ya da üç gen bölgesinin birlikteliği gözlenmiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.8. İzolatların eksprese ettikleri karbapenemaz genleri



Şekil 4.9. Direnç genlerinin jel elektroforez görünümü

Karbapenem dirençli 7 *E. coli* suşunun sadece 2'sinde *blaOXA-48* geni saptanırken, Karbapenem dirençli 6 *Enterobacter spp.* izolatının 3'ünde *blaOXA-48*, 2'sinde *blaVIM* ve 1 izolatta *blaIMP* geni tespit edilmiştir. *Enterobacter spp.* izolatlarının hiçbirinde birden fazla gen varlığı gözlenmemiştir.

PZR ile NDM gen bölgesi tespit edilen *K. pneumoniae* suşunun sekans analizi yapılarak ilgili gen bölgesinin NDM-1 olduğu doğrulanmıştır.

Tablo 4.3. NDM geni dizi analizi sonuçları

Name	BAKTERIDNA-PRIMERFORWARD	Length	330
Start	1	End	330
Subject			
DB	Ncbi	AC	KJ150691.1
Ref.	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/606315487?report=genbank&log\$=nuclalign&blast_rank=1&RID=N9KY21CM015&from=174&to=503		
Gene	Klebsiella pneumoniae strain LF138 New Delhi metallo beta lactamase 1 (blaNDM-1) gene		
Start	174	End	503
Score			
Bit	596	Raw	330
E value	5e-167		
Identities			
Match	330	Total	330
Pct.(%)	100		
Positives			
Match	330	Total	330
Pct.(%)	100		

İzole edilen suşlardan karbapenem direncine sahip olan *K.pneumoniae*, *E.coli* ve *Enterobacter spp.* izolatlarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılan karbapenemaz üretimine ait sonuçlar Tablo 4.4'de sunulmuştur.

Tablo 4.4. İzolatların fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemlere göre dağılımı

Suş No	Karbapenem Direnci			MBL E-test	MHT	Karbapenemaz Geni					
	IPM	MEM	ETP			OXA-48	OXA-58	IMP	VIM	NDM	KPC
K.P. 18	S	S	I	+	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 20	S	S	R	+	+	-	-	+	-	-	-
K.P. 23	I	I	S	+	+	+	-	-	+	-	-
K.P. 24	R	R	R	+	+	+	-	-	+	-	-
K.P. 25	R	R	R	-	-	+	-	-	-	-	-
K.P. 31	R	R	R	+	+	-	-	+	-	-	-
K.P. 34	R	R	S	+	+	-	-	+	-	-	-
K.P. 38	S	S	I	-	-	+	-	-	-	-	-
K.P. 39	S	S	R	+	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 48	I	I	S	+	-	-	-	-	+	-	-
K.P. 49	R	R	S	-	+	+	-	+	-	-	-
K.P. 50	I	I	S	+	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 51	R	R	S	-	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 54	R	R	S	+	+	+	-	-	+	-	-
K.P. 56	R	R	S	+	+	+	-	+	+	-	-
K.P. 58	R	R	S	-	-	+	-	+	-	-	-
K.P. 69	R	R	S	+	-	-	-	-	+	-	-
K.P. 70	R	R	S	-	-	+	-	-	-	-	-
K.P. 72	R	R	S	-	-	+	-	-	-	-	-
K.P. 74	R	R	I	-	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 75	R	R	I	+	+	+	-	+	+	-	-
K.P. 77	R	I	I	+	+	-	-	-	+	-	-
K.P. 78	R	S	S	-	-	+	-	-	-	-	-
K.P. 82	R	R	I	+	-	-	-	-	-	+	-
K.P. 88	R	R	S	+	+	+	-	+	-	-	-
K.P. 89	R	I	S	+	+	-	-	-	+	-	-
K.P. 94	R	R	S	+	+	-	-	+	+	-	-
K.P. 100	R	R	R	-	-	+	-	-	+	-	-
K.P. 103	R	R	I	+	+	+	-	+	+	-	-
K.P. 109	R	R	I	+	+	-	-	-	+	-	-
K.P. 110	R	I	I	+	+	-	-	-	+	-	-
K.P. 117	R	R	R	-	-	-	-	-	+	-	-
K.P. 123	S	S	I	-	-	+	-	-	-	-	-
E.C. 2	S	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-
E.C. 12	S	S	R	-	-	-	-	-	-	-	-
E.C. 14	R	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
E. C. 17	I	S	S	-	-	-	-	-	-	-	-
E. C. 22	S	R	S	-	-	-	-	-	-	-	-
E. C. 48	R	R	I	-	-	+	-	-	-	-	-
E. C. 50	S	R	S	-	-	+	-	-	-	-	-
E. 3	R	R	I	+	+	-	-	-	+	-	-
E. 4	R	R	I	+	+	-	-	-	+	-	-
E.5	R	I	I	-	-	+	-	-	-	-	-
E. 16	R	R	S	-	-	+	-	-	-	-	-
E. 17	R	I	I	+	+	-	-	+	-	-	-
E. 38	S	S	R	-	-	+	-	-	-	-	-

K.P: *K.pneumoniae*, E.C: *E.coli*, E: *Enterobacter spp.* ; S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli
MHT: Modifiye Hodge Testi; IPM: Imipenem, MEM: Meropenem, ERT: Ertapenem

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesi gerek nozokomiyal gerekse toplum kökenli enfeksiyonların önde gelen etkenlerindedir. Hücre duvarlarındaki dış membran yapısı nedeniyle antibiyotiklere dirençli olan bu mikroorganizmalar, genetik madde aktarımı ve antibiyotiklerin seçici baskısı ile çoklu direnç özelliği kazanmıştır (Gülay, 2005). Nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde *Enterobacteriaceae* ailesinin görülme sıklığı ve dağılımları hastaneler arasında farklılık göstermektedir. Amerikan Ulusal Nozokomiyal Enfeksiyon Sürveyans Sistemi (National Nosocomial Infections Surveillance System, NNIS) verileri gram negatif bakteriler ile gelişen hastane enfeksiyonu insidansında artış olduğuna dikkat çekmektedir. Buna göre, 1975 yılında görülen gram negatif kaynaklı nozokomiyal enfeksiyonlarının oranı %67,8 iken 2003'te bu oran %73,6'ya çıkmıştır (Gür, 1997). 2009-2010 National Healthcare Safety Network (NHSN) raporlarına göre nozokomiyal ilişkili enfeksiyon oranlarına bakıldığında gram negatif bakteriler arasında en çok izole edilen türlerin *E.coli* (%11,5), *Klebsiella spp.* (%8), *Enterobacter spp.* (%4,7) olduğu bildirilmektedir (Sievert, 2013).

Hastane enfeksiyonu etkeni gram negatif mikroorganizmaların değerlendirildiği çalışmaların çoğunda etkenlerin genellikle dahili birimlerden, yoğun bakım üniteleri ve cerrahi birimlerden gönderilen örneklerden izole edildiği bildirilmektedir. Işık, 2005-2006 yılları arasında Konya Meram Tıp Fakültesinde yatan hastaların kan kültürlerinden izole ettikleri 102 *Klebsiella* izolatlarının %57,8'i pediatri başta olmak üzere dahili bölümlerden, %38,2'si yoğun bakım ünitesi başta olmak üzere cerrahi bölümlerden gönderilen örneklerden izole ettiklerini bildirmişlerdir (2007). Al-Muhtaseb ve ark 2007-2008 tarihleri arasında İstanbul Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nde kan kültürüne ait 100 *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşunun %34'ünü cerrahi servislerden, %66'sını dahili servislerden gelen materyallerden izole ettiklerini belirtmişlerdir (2008). Yurtsever ve ark İzmir'de 2007 yılında yaptıkları çalışmada 2175 yara yeri örneğinden 1126 örnek izole etmiş ve bunlardan

881'i gram negatif olarak değerlendirilmiştir. 402 izolatın *E.coli* ve *K.pneumoniae* olduğu ve bunlardan %61,2'sini cerrahi servislerden, %38,8'ini dahili servislerden gelen örneklerde saptadıklarını bildirmişlerdir (2009). Tikveşli ve ark 2006-2007 yılları arasında Denizli'de yaptıkları çalışmada 217 *K.pneumoniae* suşunu değerlendirmeye almışlar ve pediatri servisi başta olmak üzere izolatların %54,3'ünü dahili, %45,7'sini cerrahi servislerden elde etmişlerdir (2009). Özmen ve ark 2003-2005 yılları arasında yaptıkları çalışmada 898 gram negatif bakteriden %58,9'unu dahili servislerden, %41,1'ini cerrahi servislerden izole etmişlerdir (2010). Duman ve ark 2009 yılında yaptıkları çalışmada, kan kültürlerinden elde ettikleri 257 gram negatif izolatı klinik dağılımlarına göre değerlendirdiğinde %67,2'si dahili servislere, %32,8'i cerrahi servislere ait örneklerden izole ettiklerini bildirmişlerdir (2011). Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak bizim çalışmamızda da 237 izolatın %46,4'ü anestezi yoğun bakım ünitesi başta olmak üzere cerrahi birimlerden gönderilen örneklerden izole edilirken, %53,6'sı pediatri bölümü başta olmak üzere dahili birimlerden gönderilen klinik materyallerden izole edilmiştir.

Gram negatif bakterilerin izole edildiği örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalara göre farklılık göstermektedir. Yapılan çalışmaları değerlendirdiğimizde; Tunçcan ve ark 2007-2008 yılları arasında yapılan çalışmada 58'i *E.coli*, 37'si *Klebsiella* olan toplam 95 suşun %44'ünü idrar, %28'ini trakeal aspirat, %14'ünü kan ve %14'ünü yara yeri örneklerinden izole ettiklerini bildirmiştir (2008). Tikveşli ve ark çalışmalarına dahil ettikleri *K.pneumoniae* izolatlarının %70'inin idrar, %9,2'sinin balgam, %6,5'inin yara yeri sürüntü örneği, %6'sının kan, %4,1'inin trakeal aspirat sıvısı, %1,4'ünün BOS, %1,4'ünün göbek sürüntüsü, %1,4'ünün göz sürüntüsü örneklerinden izole edildiğini bildirilmişlerdir (2009). Doğantekin ve ark'nın yaptıkları çalışmada 100 gram negatif basilin izole edildiği örneğin %49'u idrar, %23'ü kan, %18'i yara, %7'si balgam, %3'ü periton sıvısı olduğu belirtmişlerdir (2010). Kuzucu ve ark'nın yaptıkları çalışmada 278 *E.coli* ve *Klebsiella spp.* örneğinin %74,9'u idrar, %9,5'i yara, %5,8'i kan, %6,2'si steril vücut sıvısı, %3,6'sı diğer örneklerden oluştuğu bildirilmiştir (2011). Özmen ve ark Diyarbakır'da yaptıkları çalışmada değerlendirmeye alınan *E.coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*,

P.aeruginosa, *Acinetobacter spp*, *S.maltophilia* izolatının %31'i idrar, %30'u kan ve %21'i yara şeklindeki örneklerin oluşturduğu belirtilmiştir (2010). Hamaa ve ark'nın yaptıkları çalışmada *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *C.freundii*, *S.marcescens* suşunun %38'i idrar, %22'si abse, %12'si kan, %7'si yara sürüntüsü, %5'i balgam, %4' aspirasyon mayii, %12'si diğer örneklerden izole edildiği bildirilmiştir (2009).

Giani ve ark 2011 yılında İtalya'da 23 farklı Őehirde bulunan 25 farklı mikrobiyoloji laboratuvarından izole edilen 1346 *Enterobacteriaceae* suşunu çalışma kapsamında değerlendirmiş ve toplanan izolatların %48,6'sını idrar, %13,2'sini kan ve %16,2'sini alt solunum yolu örneklerinden izole etmişlerdir (2013).

Çalışmamızda bu verilerle uyumlu olarak izolatların %45,6'sı idrar, %20,2'si yara, %18,2'si kan, %9,7'si trakeal aspirat, %6,3' balgam örneklerinden izole edilmiştir. *E.coli*'nin üriner sistem enfeksiyonlarının %80-90'mından sorumlu etkenler olduğu düşünüldüğünde bu çalışmada da bakterilerin idrar örneklerinden daha fazla oranda izole edilmesinin nedeni olabileceği söylenebilir.

Enterobacteriaceae yelerinin oluşturduğu enfeksiyon etkenlerinde karbapenemler, antibakteriyel spektrumlarının genişliği, beta-laktamaz enzimlerine dayanıklı olmaları nedeniyle GSBL üreten gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde ve ciddi sepsislerde ilk sırada kullanılan antibiyotik grubunu oluşturmaktadır. Yıllar içerisinde GSBL pozitif suşların artışı karbapenem kullanımını da beraberinde getirmiş ve buna bağlı olarak da bu ajanlara karşı direnç gelişimi artarak tedavide ciddi problemlere yol açmıştır. Bu grup antibiyotiklerin bir yesi olan imipenem ve meropeneme karşı direnç oranları incelendiğinde; 2004-2005 yılında yapılan altı merkezin katıldığı HİTİT srveyans çalışmasında *E.coli*'de imipenem direnci saptanmazken *K.pneumoniae*'de %3,2 oranında direnç saptanmıştır (2008). Karaoğlan ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada *Klebsiella* suşlarında %3 ve *E.coli* suşlarında ise %1 oranında direnç saptamışlardır (2008), ülkemizde 2000-

2003 yılları arasında yapılan çok merkezli MYSTIC çalışmasında gram negatif bakterilerde meropenem %0,7, imipenem %2,4 oranında direnç belirlenmiştir (2007). Köksal ve ark 2001-2009 yılları arasında yaptıkları çalışmada GSBL pozitif suşlarda *K.pneumoniae* ve *E.coli*'de karbapenem direnci saptamamışlardır (2009). Benzer şekilde Duman ve ark 2009 yılında (2011), Köse ve ark 2012 yılında yaptıkları çalışmalarda imipenem ve meropenem direnci saptamamışlardır (2012). Kuzucu ve ark 2007-2008 yılları arasında *E.coli*'de imipenem ve meropenemde direnç saptamazken, *K.pneumoniae*'de %3,6 oranında direnç tespit etmişlerdir (2011). Aral ve ark'nın 2008-2011 yılları arasında idrar örneklerinden elde ettikleri isolatlarla yaptıkları çalışmada, *K.pneumoniae*'de %12,5 oranında karbapenem direnci bildirilmiş, *E.coli* ve *Enterobacter spp.*'de ise dirence rastlamamışlardır (2011). Çalışkan ve ark 2013-2014 tarihleri arasında üreme olan 2803 idrar örneğinden izole ettikleri *Klebsiella spp.*'de imipenem %1 oranında direnç saptarken, *E.coli*'de direnç saptamamışlardır (2014). Aytar ve ark 2010-2014 yılları arasında kan kültüründen izole ettikleri 199 örnekte *K.pneumoniae*'de %6 oranında karbapenem direnci saptarken, *E.coli*'de direnç görülmediğini bildirmişlerdir (2014). Eser ve ark 2005-2009 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde kan kültüründen 210 *K.pneumoniae* izolatu elde etmişler ve bu isolatların %11'inde karbapenem direnci saptamışlardır. *K.pneumoniae* imipenem ve meropenem direnç oranları sırasıyla %5,7 ve %1,9 olarak bildirilmiştir (2014).

Baroud ve ark 2008-2011 tarihleri arasında Amerikan Üniversitesi Beirut Tıp Merkezinde GSBL üreten 2243 *E.coli* ve 572 *K.pneumoniae* izolatında karbapenem direncini belirlemek için yaptıkları çalışmalarında, *E.coli*'ye ait suşların %0,3'ü imipenem, %0,5'i meropenem dirençli iken, *K.pneumoniae*'ye ait suşların %1,3'ü imipenem, %1,9'u meropenem dirençli olduğunu belirtmişlerdir (2013).

Bu çalışmada, *K.pneumoniae* izolatlarında imipenem direnci %20,3, meropenem direnci ise %19,6; *E.coli* izolatlarında imipenem direnci %5,8,

meropenem direnci ise %5,8 oranında saptanırken, *Enterobacter spp.* suşlarında imipenem ve meropenem %10,7 oranında direnç saptanmıştır.

Ertapenem non-fermentatif bakterilere karşı sınırlı etkinliğe sahip olup son yıllarda klinik kullanıma giren karbapenemlerden biridir. Yapılan çalışmalara bakıldığında ertapenem karşı; Yılmaz ve ark *E.coli*'de %3, *K.pneumoniae*'de ise %13 direnç saptarken (2009), SMART çalışmasının 2003-2007 verilerinde *E.coli*'de %5,3 oranında direnç bildirilirken *K.pneumoniae*'de direnç saptanmadığı belirtilmiştir (Guembe, 2008). Karaoğlan ve ark *E.coli* suşlarında ertapenem %4, *Klebsiella* suşlarında %3 oranında direnç belirlemişlerdir (2008). Aral ve ark *E.coli*'de %0,3 ertapenem direnci saptarken, *K.pneumoniae*'nin poliklinik izolatlarında %6, klinik izolatlarında %18,7 oranında direnç tespit etmiş ve *Enterobacter spp.*'de direnç saptanmamışlardır (2011). Kuzucu ve ark 2007-2008 yılları arasında *E.coli*'de %0,8, *K.pneumoniae*'de %3,6 (2011); Eser ve ark 2005-2009 yılları arasında yaptıkları çalışmada *K.pneumoniae* suşlarında %2,4 oranında ertapenem direnci bildirmişlerdir (2014). Baroud ve ark çalışmalarında; *E.coli*'de %1,1, *K.pneumoniae*'de %2,4 oranında ertapenem direnç saptamış, aynı zamanda bu izolatlar içerisinde 3 *E.coli* izolatı ve 5 *K.pneumoniae* izolatının imipenem, meropenem ve ertapenem dirençli olduğunu bildirmişlerdir (2013).

Bu çalışmada; *K.pneumoniae*'de %12,3, *E.coli*'de %5,8, *Enterobacter spp*'de %10,7 oranında diğer çalışmalara göre daha yüksek ertapenem direnci tespit edilmiştir. Her 3 karbapenem karşı çalışmamızda yüksek oranda direnç gözlenmiş olmasının, hastanemizde ampirik tedavide genellikle bu grup antibiyotiklerin tercih edilmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda sefalosporin grubu antibiyotiklere direnç oranının gittikçe arttığı görülmektedir. Ülkemizin de katıldığı, farklı merkezlerin katılımıyla yapılan EARSS çalışmasında 2003'te sefalosporin direnç oranı *E.coli*'de %25,6 iken bu oran 2008'de %41,6 olmuştur. *K. pneumoniae*'de ise

2006'da %44,9 iken 2008'te %46,1 şeklinde artış göstermiştir (Korten, 2007). Ülkemizde yapılan çalışmalarda sefalosporin grubu antibiyotiklerin direnç oranlarını incelediğimizde; Aral ve ark 2008-2011 yılları arasında yaptıkları çalışmada CAZ direncini *K.pneumoniae*'de %49, *E.coli*'de %43, *Enterobacter spp.*'de %66,7 olarak; CRO direncini ise *K.pneumoniae*'de %16,3, *E.coli*'de %43, *Enterobacter spp.*'de %66,7 olarak saptamışlardır (2011). Karaoğlan ve ark 2008 yılında yaptıkları çalışmada *K.pneumoniae*'de %36, *E.coli*'de %59 oranında CAZ direnci; *K.pneumoniae*'de %36, *E.coli*'de %60 oranında CRO direnci tespit etmişlerdir (2008). Duman ve ark 2009 yılında yaptıkları çalışmada CAZ direncini, *Klebsiella spp.*'de %40,3, *E.coli*'de %17,9 olarak bildirmişlerdir (2011). Köksal ve ark 2001-2009 yılları arasında yaptıkları çalışmada GSBL pozitif suşlarda CAZ ve CTX direnç oranını *K.pneumoniae*'de %100, *E.coli*'de %100 saptamışlardır (2009). Tosun ve ark 2012-2014 tarihleri arasında 1196 idrar kültüründen en sık izole ettikleri üç gram negatif bakterinin CRO direncini ayaktan hastalarda, *E.coli*'de %24,4, yatan hastalarda %46,5, *K.pneumoniae*'de ayaktan hastalarda %32,1, yatan hastalarda %65,4 olarak saptamışlardır (2014). Çalışkan ve ark 2013-2014 tarihleri arasında CRO direncini, *Klebsiella*'da %70,8, *E.coli*'de %58,3 şeklinde bildirmişlerdir (2014). Akçay ve ark Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde izole ettikleri gram negatif basillerin antibiyotik direnci ile ilgili yaptıkları ve 2004-2011 yıllarını kapsayan sürveyans çalışmasında; bu yıllar içerisinde *E.coli* suşlarında CAZ direncinin %51,6, %82,7, CRO direncinin %53,2, %82,7; *Klebsiella spp.* suşlarında CAZ direncinin %76,2, %93,9, CRO direncinin %78,6, %93,8; *Enterobacter spp.* suşlarında CAZ direncinin %44, %77,4, CRO direncinin %52,4, %91,6 aralığında değiştiği bildirilmiştir (2014).

Çalışmamızda, *E.coli* için CAZ %92,3, CTX %92,3, CRO %92,3 şeklinde direnç oranları saptanmıştır. *K.pneumoniae* için; CAZ %59,4, CTX %60,9, CRO %65,9, *Enterobacter spp.* için; CAZ %76,6, CRO %74,4, CTX %53,2 oranında direnç saptanmıştır. Hastanemizde izole edilen suşlarda üçüncü kuşak sefalosporinlere yüksek oranda direnç olması, bu ilaçların hastanemizde yaygın

kullanımına, çalışmaya dahil edilen suşların büyük kısmının GSBL üreten suşlar olmasına bağlı olabilir

Enterobacteriaceae türlerinde aminoglikozidlere direnç büyük çoğunlukla plazmid, kromozom ya da transpozonlarda bulunan genler tarafından kodlanan modifiye edici enzimlerle olmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda aminoglikozid direnç oranları, Karaoğlan ve ark'nın çalışmalarında AK için *K.pneumoniae*'de %13, *E.coli*'de %40; CN için *K.pneumoniae*'de %26, *E.coli*'de %41; TOB için *K.pneumoniae*'de %28, *E.coli*'de %52 oranında direnç saptamışlardır (2008). Duman ve ark yaptıkları çalışmada *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında CN direncini *Klebsiella*'da %10,8, *E.coli*'de %27,6 oranında saptarken, her iki bakteride de AK'e karşı direnç saptanmadığını, TOB'e karşı direncin ise %100 olduğunu bildirmişlerdir (2009). Tosun ve ark 2012-2014 tarihleri arasında idrar kültürlerinden izole ettikleri *E.coli* suşlarında AK direncini ayaktan hastalarda %0,5, yatan hastalarda %1,6; *K.pneumoniae*'de ayaktan hastalarda %3,4, yatan hastalarda %8,4 oranında saptamışlardır. Aynı çalışmada CN direncini, *E. coli*'de ayaktan hastalarda %13,2, yatan hastalardan %35,4, *K.pneumoniae*'de ayaktan hastalarda %12,5, yatan hastalarda %37,3 olarak saptamışlardır (2014). Çalışkan ve ark idrar örneklerinden izole edilen *Klebsiella* ve *E.coli* suşlarında AK direncini sırasıyla %15, %11 oranında, CN direncini %20, %18 şeklinde bildirmişlerdir (2014). Aytar ve ark 4 yılı kapsayan bir süreçte kan kültürlerinden izole edilen suşlarda AK direncini *K.pneumoniae*'de %3, *E.coli*'de %5,2; CN direncini ise, *K.pneumoniae*'de %39,2, *E.coli*'de %27,5 olarak saptamışlardır (2014). Akçay ve ark Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde izole ettikleri gram negatif basillerin antibiyotik direnci ile ilgili yaptıkları ve 2004-2011 yıllarını kapsayan sürveyans çalışmasında; bu yıllar içerisinde *E.coli* suşlarında AK direncinin %1,4, %10,9, CN direncinin %15,7, %50,9; *Klebsiella spp.* suşlarında AK direncinin %12,5, %33,3, CN direncinin %15,2, %44,3; *Enterobacter spp.* suşlarında AK direncinin %7,5, %21,7, CN direncinin %13,4, %36,2 aralığında değiştiği belirtilmiştir (2014).

Bu çalışmada aminoglikozid direnç oranları AK, CN ve TOB için sırasıyla *E.coli*'de %1,9, %71,1, %78,1 iken; *K.pneumoniae*'de %44,2, %43,5, %42,7; *Enterobacter spp.*'de ise %4,2, %12,8, %14,9 şeklindedir. Çalışmada irdelenen izolatların büyük bir çoğunluğunun yatan hastalara ait olması nedeniyle aminoglikozid grubu antibiyotiklere karşı direncin yüksek olması beklenen bir bulgudur.

Florokinolonlar ülkemizde kullanıma girdikten sonra çok miktarda kullanılmakta olan antibiyotik grubudur. Yapılan çalışmalarda; Karaoğlan ve ark LEV direncini *K.pneumoniae*'de %21, *E.coli*'de %63, CIP direncini ise *K.pneumoniae*'de %18, *E.coli*'de %58 oranında bildirirken (2008); Tosun ve ark LEV direncini ayaktan hastalarda *E. coli*'de %24,7, *K.pneumoniae*'de %14,6; yatan hastalarda *E.coli*'de %48,2, *K.pneumoniae*'de %34,7; CIP direncini ise ayaktan hastalarda *E. coli*'de %25,2, *K.pneumoniae*'de %15,4; yatan hastalarda *E.coli*'de %48,8, *K.pneumoniae*'de %38,1 oranında bildirmişlerdir (2014). Çalışkan ve ark CIP direnç oranını *Klebsiella*'da %16, *E.coli*'de %12 (2014); Aytar ve ark CIP direncini *K.pneumoniae*'de %44,3, *E.coli*'de %52,5 saptadıklarını bildirmişlerdir (2014). Akçay ve ark Haydarpaşa Numune Hastanesi'nde izole ettikleri gram negatif basillerin antibiyotik direnci ile ilgili yaptıkları ve 2004-2011 yıllarını kapsayan sürveyans çalışmasında; bu yıllar içerisinde *E.coli* suşlarında LEV direncinin %41,4, %76,4, CIP direncinin %49,4, %74,1; *Klebsiella spp.* suşlarında LEV direncinin %16,3, %81, CIP direncinin %22,1, %79,2; *Enterobacter spp.* suşlarında LEV direncinin %13,9, %55,4, CIP direncinin %15,3, %53,6 aralığında değiştiği gösterilmiştir (2014).

Bu çalışmada florokinolon direnç oranları sırasıyla CIP ve LEV *E.coli*'de %71,1, %73,1; *K.pneumoniae*'de %34,7, %26,9; *Enterobacter spp.*'de %10,7, %6,3 şeklinde saptanmıştır. Çalışmada değerlendirilen izolatlarda kinolon grubu antibiyotiklerin direnç oranları yapılan çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Son yıllarda kinolon grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç nozokomiyal ve toplumsal

enfeksiyonların tedavisinde büyük sorun oluşturmaktadır. *Enterobacteriaceae* suşlarının ürettiği beta-laktamazlar, kinolonlar ve AmpC enzimlerinin direnci bu etkenlerle gelişen enfeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanımını gerektirmektedir. Bu durum metallo-beta-laktamazların, KPC ve OXA grubu enzimlerinin yayılmasına neden olduğu düşünülmektedir.

Karbapenemazları saptamada kullanılan fenotipik testler için yapılan çalışmalar incelendiğinde; Alışkan ve ark 2009-2011 yıllarında Adana Başkent Üniversitesi Hastanesinde yaptıkları çalışmada 952 *Enterobacteriaceae* izolatında CLSI önerileri doğrultusunda MHT uygulamış ve 13 izolatta MHT pozitifliği gözlediklerini bildirmişlerdir. Pozitiflik gözlenen 13 izolatın %62'sinin *K.pneumoniae*, %15 *E. coli*, %15 *E.aerogenes*, %8 *K.oxytoca* olduğu bildirilmiştir (2011). Limbago ve ark 2009-2010 yılında yenidoğan yoğun bakım ünitesinde infantlardan izole edilen suşların yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerinde 3 izolatın karbapenemlere dirençli olduğunu belirtmiş ve karbapenem dirençli 3 izolatta MBL gen bölgelerinden IMP ve NDM saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu 3 suşa da MHT ve MBL-E test yapılmış ve 3'ünün de MHT ve MBL-E test sonucunun pozitif olduğu belirtilmiştir (2011).

Bizim çalışmamızda da MHT ile 19 izolat, MBL E test ile 24 izolat pozitif saptanmıştır. Karbapenemaz aktivitesini *Enterobacteriaceae* türlerinde test etmek için CLSI tarafından önerilen bir test olan MHT'nin karbapenemaz üretimini belirlemede duyarlılığı yüksek olmasına rağmen enzimin tipini belirleyememesi dezavantajdır. Çalışmalarda MHT, MBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında hem sonuçların yorumunun zor olması hem de duyarlılık ve özgüllüğünün düşük olması nedeniyle önerilmemektedir (EUCAST, 2013). Rutinde kullanılması zor ve zaman alıcı olması nedeniyle alternatif bir test olarak kullanılan diğer bir fenotipik yöntem MBL-E testtir. Yapılan fenotipik testler içerisinde MBL-E test duyarlılık ve özgüllüğü en yüksek bulunduğu için doğrulama yöntemlerinde kullanılması önerilmektedir. Fakat kullanılan fenotipik testlerden hiçbirisinin karbapenemaz

aktivitesini saptamak için altın standart yöntem olmadığı belirtilmekte ve moleküler çalışmaların gerekliliğini vurgulanmaktadır.

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar, metallo-beta-laktamazlar (MBL), oksasilinazlar (OXA) ve serin karbapenemazlardır. IMP, VIM, SPM-1, SIM-1, VIM-2 tip MBL'ler içerisinde en baskın olan direnç genlerinin IMP ve VIM olduğu bildirilmektedir. *Enterobacteriaceae* üyelerinde ise en fazla VIM-1'in bulunduğu ve özellikle Akdeniz ülkelerinde görüldüğü belirtilmektedir (Taşova, 2011; Hamaña, 2009; Ho, 2010).

İlk VIM enzimi (VIM-1) 1997 yılında İtalya'da bir *P.aeruginosa* suşunda bulunmuş ve kromozomal kaynaklı olduğu saptanmıştır. 2001 yılında ise Koreli bir hastaya ait *S.marcescens* izolatında VIM-2 enzimi bulunmuştur (Bush, 2010). VIM tipi enzimler özellikle Avrupa ve Güney Asya ülkelerinde sıklıkla *P.aeruginosa* suşlarından izole edilmişlerdir. Ancak VIM-7 enzimi ABD'den bildirilmiştir. VIM varyantları ilk olarak *P.aeruginosa*'da izole edilmesine rağmen daha sonra *Enterobacteriaceae* ve gram negatif çomaklardan saptanmıştır (Walsh, 2003). Günümüze kadar 12 adet VIM varyantı saptanmış ve bunlar VIM-1, VIM-2 ve VIM-7 olmak üzere üç alt grupta toplanmışlardır (Mendes, 2004; Pournaras, 2005).

Kaase ve ark 2012'de Almanya'da 40 farklı laboratuvardan gönderilen izolatlarla yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesine ait 132 izolatta VIM, KPC, IMP, NDM, OXA-48 gen bölgesi çalışmışlar ve VIM-1, VIM-2, VIM-4, VIM-26 gen bölgesini tanımlamış ve oranlarını sırasıyla %13,6, %1,4, %2,1, %1,4 olarak bildirmişlerdir (2012). Woodford ve ark 2010 yılında karbapenem dirençli 55 *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenemaz gen bölgelerini çalışmış ve 3 *K.pneumoniae* (%5,4) izolatında VIM enzimi saptamışlardır (2010). Kim ve ark karbapenem dirençli 22 *Enterobacteriaceae* izolatından sadece *K.pneumoniae* suşlarının birinde %4,5 VIM-2 saptamışlardır (2013). Girlich ve ark Fransa'da 2013

yılında 133 *Enterobacteriaceae* izolatu ile yaptıkları çalışmada MBL ve KPC gen bölgelerini araştırmış ve MBL'lara ait 19 (%14,2) izolatta VIM gen bölgesini saptamışlardır (2013). Kasım 2009-2010'da Yunanistan, İtalya ve ABD'den gönderilen *K.pneumoniae* izolatlarından 3 suşta VIM enzimi saptandığı CDC tarafından bildirilmiştir (2011).

Türkiye'de 2003 yılında *Enterobacteriaceae* üyesi olan *K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa*'da izolatlarında VIM-5 üreten MBL saptanmıştır. Gacar ve ark 2003 yılında İstanbul'da *E.cloaceae* suşunda VIM-5 varyantı saptamıştır (2005). Gelmez ve ark 2013 yılında pediatri kliniğinde yatan hastaların rektal sürüntü örneklerinden izole ettikleri 762 suşun %9,7'sinin karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, %21,3'ünün karbapenem dirençli nonfermenter bakteriler olduğunu bildirmişlerdir. Bu izolatlardan *K.pneumoniae* suşlarının %88,2'sinde karbapenemaz gen bölgeleri saptarken, VIM ve KPC genleri gözlememişlerdir (2014). Altındış ve ark 2014 yılında karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 44 *Enterobacteriaceae* izolatu çalışmaya dahil etmişler ve karbapenemaz genlerinin hızlı tanısında kullanılan Check-Direct CPE testi ile VIM gen bölgesi saptayamamışlardır (2014). Aşık ve ark 2013-2014 yılında 22 Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında VIM, IMP, KPC, OXA-48, NDM gen bölgeleri çalışmış ve çalışılan izolatların 6'sında (%13,6) VIM gen bölgesi saptamışlardır (2014). Karatuna ve ark 2011 ve 2014 tarihlerinde İstanbul'da yaptıkları çalışmada 190 izolatu 147'si *Klebsiella spp.* ve 43'ü ise *E.coli* olarak tanımlanmış *K.pneumoniae*'ye ait bir (%0,7) izolatta VIM geni saptanmıştır (2014).

Çalışmamızda 237 *Enterobacteriaceae* izolatlarının 138'i *K.pneumoniae*, 52'si *E.coli*, 47'si *Enterobacter spp.* olarak tanımlandı ve *K.pneumoniae*'ye ait 19 (%13,8) ve *Enterobacter spp.*'ye ait 2 (%4,2) izolatta VIM gen bölgesi saptandı. MBL'lara ait VIM gen bölgesi IMP ve NDM'ye göre *Enterobacteriaceae* üyelerinde daha yüksek oranda saptanmakta olup bizim çalışmamızda da yapılan çalışmalarla uyumlu olarak MBL enzimlerinden VIM geni daha yüksek oranda bulunmuştur.

IMP tipi enzimler *Enterobacteriaceae*, *P.aeruginosa* ve diğer gram negatif nonfermentatif bakterilerden izole edilen ilk MBL'lerdir ve ilk kez 1991 yılında Japonya'da izole edilen *S.marcescens* suşunda bildirmiştir (Lynch, 2013). IMP-1'in Uzak Doğu'nun diğer ülkelerinde, Avrupa'da, Kanada'da, ABD'de, Güney Amerika'da ve Kuzey Afrika'da da görülmesi bu enzimin geniş bir yayılım gösterdiğine işaret etmektedir (Toleman,2002). IMP-1'in bir varyantı olan IMP-2 İtalya'da bir *A.baumannii* suşundan izole edilmiş ve bu ilk Avrupa örneği olmuştur (Shibata, 2003).

Kaase ve ark. 2012 tarihinde Almanya'da 40 farklı laboratuvardan gönderilen izolatlarla yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesine ait 132 klinik örnekte IMP-13 ve IMP-14 gen bölgeleri belirlemiş ve gen bölgelerinin oranlarını sırasıyla %0,7, %1,5 olarak bildirilmiştir (2012). Woodford ve ark 2012 yılında 55 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyesi suşlarda karbapenemazlara ait gen bölgeleri çalışmış ve *K.pneumoniae*'de %12,7, *E.cloaceae*'da %3,6 ve *E.coli*'de %1,8 oranında IMP geni saptamışlardır (2012). Amerika'da 2009-2010'da CDC'ye gönderilen 13 MBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinden *K.pneumoniae* izolatlarının 3'ünde IMP enzimi saptandığı rapor edilmiştir (2011). Girlich ve ark 2013 yılında Fransa'da yaptıkları çalışmada 133 *Enterobacteriaceae* üyesinde MBL'ların ve KPC'nin araştırıldığı çalışmada 54 suşta MBL saptamış, bunların %12,7'sinin IMP türü MBL olduğunu bildirmişlerdir (2013). Kim ve ark 2005-2006 ve 2011-2012 yılları arasında Kore'de yaptıkları sörveyans çalışmasında karbapenem dirençli 35 izolatta IMP gen bölgesini çalışmış ve izolatların %2,8'inde IMP geni saptamışlardır (2013).

Ülkemizde bu enzimlerden daha çok sporadik vakalarla bahsedilmiştir. Aktaş ve ark 2006'da Türkiye'de bir yaşındaki nöroblastomalı bir çocuğun kan kültüründen izole edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatında ilk defa IMP-1 rapor etmişlerdir (2008). Alp ve ark 2013 yılında Kayseri'de 137 hastadan izole ettikleri karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının 94'ünde direnç saptamış ve direnç

saptanan izolatların üçünde (%3,2) IMP geni saptamışlardır (2013). Aşık ve ark 2013-2014 tarihlerinde Afyon'da yaptıkları çalışmada 22 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatında karbapenemaz gen bölgelerini çalışmışlar ve MBL'lara ait IMP genini 4 izolatta saptamışlardır (2014). Karatuna ve ark 2011-2014 tarihleri arasında İstanbul'da yaptıkları çalışmada 190 *Enterobacteriaceae* ailesine ait izolatta karbapenemaz genlerinden MBL'lara ait IMP gen bölgesi çalışmışlar fakat izolatlarda IMP gen bölgesi saptamamışlardır (2014).

Bu çalışmada MBL karbapenemaz geni tespit edilen 33 suşun 11'inde (10 *K.pneumoniae*, 1 *Enterobacter spp.*) IMP türü MBL saptanmıştır. Yapılan çalışmalarla uyumlu olarak IMP gen oranı VIM oranından daha düşük belirlenmiştir

New Delhi metallo-beta-laktamaz-1 (NDM-1) üretebilen patojenlerin ortaya çıkması dünya genelinde önemli bir problemdir. Yeni Delhi'de hastanede yatarken İncecik'e transfer edilen bir hastadan izole edilen *K.pneumoniae* ve *E.coli* suşunda saptanan NDM-1 geni ilk kez 2008 yılında bildirilmiştir (Yong, 2009). Diğer direnç mekanizmalarının birlikteliği ile *bla*NDM-1, çoğu *Enterobacteriaceae* üyelerini, antibiyotiklerin çoğuna dirençli, sadece kolistin ve daha az olarak tigesikline duyarlı hale getirir (Yong, 2009).

Kaase ve ark tarafından Almanya'da farklı laboratuvarlardan izole edilip referans laboratuvarına gönderilen 65 *K.pneumoniae*, 18 *E.coli*, 35 *Enterobacter spp.* ve 14 diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine ait olan 132 suşta NDM-1 geni araştırılmış ve 2 *K.pneumoniae* ve 2 *E.coli* izolatında NDM-1 geni saptanmıştır (2012). Baroud ve ark. 2012 yılında Lübnan'da üçüncü basamak bir hastanede GSBL-pozitif 2243 *E.coli* ve 572 *K.pneumoniae* izolatında 14 *K.pneumoniae*, 24 *E.coli* izolatında karbapenem direnci saptanmış. Direnç saptanan *K.pneumoniae* izolatlarının ikisinde NDM-1, birinde ise hem NDM-1 hem de OXA-48 geninin varlığını bildirmişlerdir (2013). Drew ve ark. 2013 yılında İngiltere'de yaptıkları bir çalışmada 17 *K.pneumoniae* izolatının dördünde NDM-1 tespit etmişlerdir (2013). Doyle ve ark

2012 yılında Amerika’da yaptıkları çalışmada 142 *Enterobacteriaceae* üyesine ait izolatta karbapenem direnci ve ilgili gen bölgeleri çalışılmış, izolatların %19,1’inde NDM-1 geni saptamışlardır (2013).

Poirel ve ark tarafından ülkemizde 2011 yılında yapılan çalışmada, NDM-1 üreten *K.pneumoniae* ST38 dizi tipinin Irak’tan Fransa’ya uluslararası transferi gösterilmiştir. Dolayısıyla araştırmacılar daha sonra Türkiye’de izole ettikleri suşun muhtemelen başka bir ülkeden transfer edildiğini ileri sürmüşlerdir (2012). Yanık ve ark 2011’de Karadeniz bölgesinde yaptıkları bir çalışmada karbapeneme dirençli 210 gram negatif izolatın hiçbirinde NDM-1 gen pozitifliği tespit etmediklerini bildirmişlerdir (2013). Alp ve ark’nın 2010-2011 yılında Kayseri’de yaptıkları çalışmada 137 hastaya ait karbapenem dirençli 94 *K.pneumoniae* izolatının birinde hem OXA-48 hem de NDM-1, dördünde NDM-1 belirledikleri bildirilmiştir (2013). Aşık ve ark 2013-2014 tarihlerinde Afyon’da yaptıkları çalışmada 22 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatında NDM-1 gen bölgesi saptamamışlardır (2014). Karatuna ve ark 2011-2014 tarihleri arasında 190 *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatının 24’ünde (%16,7) NDM-1 geni saptamışlardır.

Bu çalışma kapsamında izole edilen 138 *K.pneumoniae* suşunun sadece birinde NDM-1 geni saptanmıştır. Ülkemizde yapılan çalışma sonuçları NDM-1 varlığının ülkemizde henüz çok yaygın olmadığını göstermektedir. Ancak NDM-1 plazmid ile kodlanan bir enzim olduğundan ve farklı coğrafyalar arası insan seyahatleri giderek arttığından, bu direncin ülkemizde de bakteriler arasında yayılma riski bulunmaktadır.

Ambler sınıf D’de bulunan OXA beta-laktamazlardan OXA-48 ülkemizden en fazla *K.pneumoniae* ve daha az olarak *E.coli*’de rapor edilmiştir (Carrer, 2008). *K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 ilk olarak 2001 yılında Türkiye’den izole edilen bir suşta gösterilmiş ve daha sonra artan sıklıkla bildirimler yapılmıştır (Canton, 2012).

Prefier ve ark. 2008-2010'da Almanya'da yaptıkları çalışmada 5 ayrı hastaneden izole edilen 8 hastaya ait 9 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyesi izolatların 6'sında OXA-48 karbapenemaz geni saptamışlardır (2011). Girhlich ve ark 2012'de Morocco'da yapılan bir prevalans çalışmasında *E.coli*, *K.pneumoniae*, *E.cloaceae*'ye ait 77 izolatın 10'unda (%13) OXA-48 saptamışlardır (2013). Kocsis ve ark. 2011'de İtalya'da yaptıkları çalışmada yoğun bakımda yatan Libyalı bir mültecinin kan kültüründen izole edilen *K.pneumoniae* suşunda OXA-48 bildirmişlerdir (2013). Woodford ve ark. Health Protection Agency's Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory (ARML) tarafından 55 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenemazlara ait 5 gen bölgesi çalışılmış ve *K.pneumoniae*'ye ait 10, *E.coli*'ye ait 11 izolatta OXA-48 pozitif bulunmuştur (2012).

Aktaş ve ark 2004-2005 yılları arasında beş aylık dönemde izole edilen 162 *K.pneumoniae* izolatı içerisinde meropenem tedavisi almış, uzun süre hastanede yatış öyküsü olan iki çocuk hastaya ait suşda OXA-48 pozitifliği saptamışlardır (2008). Carrer ve ark İstanbul'da bir Üniversite hastanesinde OXA-48 üreten karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşu ile oluşan hastane kaynaklı salgın bildirmişlerdir (2008). Biçmen ve ark 2012 yılında *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncini ve sorumlu moleküler mekanizmalarını araştırdıkları çalışmalarında karbapenem dirençli 197 izolatın %93,4'ünde OXA-48 pozitifliği saptamış ve bu izolatların 161 *K.pneumoniae*, 15 *Enterobacter spp*, 5 *E.coli*, 2 *S.marcescens*, 1 *M.morganii* olduğunu bildirmişlerdir (2012). Aşık ve ark 2012 yılında Afyon'da yaptıkları çalışmada 118 *K.pneumoniae*'ye ait suşlarda 22 (%18,6) OXA-48 pozitifliği saptadıklarını bildirmişlerdir (2012). Alp ve ark 2010-2011'de Kayseri'de yaptıkları bir çalışmada 94 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşunun 86'sında (%91,5) OXA-48 pozitifliği saptamışlardır (2013). Çiftçi ve ark 2011-2012 yılları arasında Sakarya'da 273 *K.pneumoniae* suşunu değerlendirmiş ve farklı zamanlarda farklı kliniklerde tedavi görmekte olan iki hastada karbapenem direnci saptamışlar ve bu iki suşta OXA-48 pozitifliği bildirmişlerdir (2013). Aşık ve ark ilimizde yaptıkları bir çalışmada 4 aylık bir süreçte izole edilen 22 karbapenem dirençli *K.pneumoniae*

izolatının tamamında OXA-48 geni saptadıklarını bildirmişlerdir (2014). Karatuna ve ark 2011-2014 tarihleri arasında İstanbul'da yaptıkları çalışmada 190 *K.pneumoniae* ve *E.coli*'de OXA-48 pozitifliğini 107 (%74,3) suşta saptamışlardır (2014).

Bu çalışmada, 138 *K.pneumoniae* suşunun 21'inde (%15,2), 47 *Enterobacter spp.* suşunun 3'ünde, 52 *E.coli* suşunun 2'sinde OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. Son birkaç yıl içerisinde ise karbapenemaz üreten izolatlara bağlı enfeksiyonlardaki artış oranı, bu artışın özellikle OXA-48'in toplum kaynaklı yayılımına bağlı olabileceğini düşündürmektedir.

Kazanılmış karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazlar içinde önemli bir yere sahip olan OXA-58 ilk olarak Fransa'da saptanan *A.baumannii* suşunda bildirilmiştir (Poirel, 2005). OXA-58 Fransa, İngiltere, Arjantin, İspanya, Türkiye, Romanya, Yunanistan, Avusturya, İskoçya ve Kuveyt gibi tüm dünyadan farklı coğrafik bölgelerden rapor edilmiştir (Özdemir, 2011).

Tomasz ve ark Kasım 2010-Nisan 2011 tarihleri arasında 20 gram negatif bakteride OXA-51, OXA-58, VIM-1 ve DIM-1 gen bölgeleri çalışılmıştır. Çalışma sonuçlarında izolatların %40'ı *bla*_{OXA-51-like} ve *bla*_{OXA-58-like} genleri tanımlanmış, bu gen bölgeleri daha önce yapılan çalışmalarda *A. baumannii* suşlarında izole edildiği için *K.pneumoniae*, *E.coli* ve *Enterobacter spp.* izolatlarında tanımlanması sürpriz olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile araştırmacılar diğer gram negatif bakterilerde de OXA-58 ve OXA-51 karbapenemaz gen bölgelerinin bulunabileceğinin kanıtını sunmuşlardır (2013).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada; Yazıcı ve ark 2011 Nisan- Haziran aylarında çeşitli kültürlerden izole edilen 32 *Klebsiella* türü ile yaptıkları çalışmada karbapenem direnci saptanan 4 suşun birinde OXA-58-like, OXA-51-like, OXA-48-like gen bölgelerinin varlığını bildirmişlerdir (2014).

Bizim çalışmamızda izole edilen *Enterobacteriaceae* suşların hiçbirinde OXA-58 gen bölgesi saptanmamıştır. *Enterobacteriaceae*'da OXA-58 gen bölgesinin varlığını belirlemek için yapılmış çalışmalar çok nadirdir. Yapılan çalışma sonuçları ise bu gen bölgelerinin artık sadece *A. baumannii* türlerinde görülmediğinin kanıtı olabilir

K.pneumoniae'nın ürettiği plazmid kökenli karbapenemazlardan biri olan KPC; ilk kez 1996 yılında ABD'de tanımlanmış ve KPC ile oluşan salgının başlıca merkezi New York olmak üzere ABD'de bildirilmiştir (Woodfor, 2003; Yiğit, 2001).

Kaase ve ark Almanya'da 2012 yılında yaptıkları çalışmada 132 *Enterobacteriaceae* (65 *K.pneumoniae* suşu ve 18 *E.coli*) izolatında KPC-2 ve KPC-3'ünde içeren farklı gen bölgelerini çalışmış ve 13 suşta KPC-2, 11 suşta KPC-3 geni ve 1 suşta hem KPC-2 hem de VIM-1 gen bölgesi görüldüğü bildirilmiştir (2012). Woodford ve ark 2010 yılında Health Protection Agency's Antibiotic Resistance Monitoring and Reference Laboratory (ARMRL) tarafından yapılan çalışmada karbapenem dirençli 55 izolatın 8'inde (%14,5) (7 *K.pneumoniae*, 1 *E.cloaceae*) KPC geni saptadıklarını belirtmişlerdir (2012). Drew ve ark 2011 ve 2012 yılları arasında İngiltere'de yaptıkları on iki aylık çalışma periyodunda karbapenem direnci saptanan 24 *Klebsiella spp.* izolatının 3'ünde (%12,5) KPC gen bölgesini saptamışlardır (2013). Doyle ve ark 2008 ve 2009 yılları arasında SMART sürveyans programı çalışmasından elde edilen 142 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella spp.*, *E.coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*) izolatının 49'unda (%34,5) KPC geni saptadıklarını belirtmişlerdir (2012). Yang ve ark Çin'de 2004-2008 yılları arasında yaptıkları çalışmada dirençli 49 *Enterobacteriaceae* izolatının 6'sında (4 *K.pneumoniae* ve 2 *E.coli*) KPC-2 geni saptamışlardır (2010). Fontana ve ark 2009 yılında İtalya'da bir üniversite hastanesinde hastalardan elde ettikleri 2 *K.pneumoniae* izolatında KPC geni varlığını bildirmişlerdir (2010). Giani ve ark 2011 yılında İtalya'da 13.749 *Enterobactreiaceae* suşu izole etmişler ve karbapenem

direnci saptanan 270 suşun 205'inde (204 *K.pneumoniae*, 1 *E.coli*) KPC geni bildirmişlerdir (2013).

Ülkemizde yapılan çalışmalarda; Çiftci ve ark 2011-2012 yılları arasında Sakarya Üniversitesi Hastanesi'nde yaptıkları çalışmada 273 *K.pneumoniae* izolatının karbapenem dirençli olan suşunda (2013); Aşık ve ark 2013-2014'de Afyon'da 22 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmada KPC gen bölgesi saptanmadığını bildirmişlerdir (2014). Karatuna ve ark 2011-2014 yılları arasında İstanbul'da yapılan çalışmada 190 *Enterobacteriaceae* suşunda KPC gen bölgesi de çalışılmış ve sadece 1 suşta (%0,7) KPC geni saptamışlar (2014).

Çalışmamız sonuçlarında ise; 237 *Enterobacteriaceae* izolatı içerisinde 46 suşta (%19,4) karbapenem direnci saptandı ve direnç saptanan suşların 41'inde (%89,1) karbapenemaz geni saptanmıştır. Karbapenemaz direnci saptanıp herhangi bir direnç geni saptanmayan 5 suşta karbapenem direncinden sorumlu mekanizmanın porin kaybı ile birlikte ESBL ya da yüksek düzey AmpC varlığı olabileceği düşünülmüştür.

Bu çalışmada izolatların hiçbirinde KPC geni saptanmamıştır. KPC gen varlığı Avrupa'da çok yaygın olmasına rağmen günümüze kadar ülkemizden sadece tek bildirim yapılmıştır. 2014 yılında İstanbul'da yapılan çalışma ile Bursa kaynaklı bir *K.pneumoniae* izolatında saptanmış olup DNA dizileme yöntemi ile KPC-2 gen bölgesi ile uyumlu olduğu saptanmış ve ülkemizden ilk kez KPC geni bildirimini yapılmıştır (2014).

Tablo 5.1. *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz genlerinin dağılımı ile ilgili son 2 yılda yapılan çalışmaların verileri

Kaynak	Yer	Yıl	Suş sayısı(n)	IMP(%)	VIM(%)	NDM(%)	OXA-48(%)	OXA-58(%)	KPC(%)
Alp ve ark	Kayseri	2013	94	3,2	-	4,3	91,5	-	-
Aşık ve ark	Afyon	2014	22	18,1	27,2	-	100	-	-
Karatuna ve ark	İstanbul	2014	190	-	0,7	16,7	74,3	-	0,7
Giani	İtalya	2012	270	-	7,7	-	1,1	-	75,9
Drew	İngiltere	2013	421	-	-	16,6	-	-	12,5
Doyle	Amerika	2012	142	3,5	13,3	19,1	9,8	-	34,5
Kaase	Almanya	2012	132	2,2	18,1	5,3	18,1	-	18,1
Kim	Kore	2013	35	2,8	2,8	8,5	-	-	-
Girlich	Fransa	2013	133	13,5	14,2	12,7	-	-	36,1
Çalışmamız	Afyon	2013	237	4,7	8,9	0,4	11	-	-

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmada, Afyon Kocatepe Üniversitesi Araştırma Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına Ocak 2012-Aralık 2012 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gönderilen materyallerden izole edilen 138 *K.pneumoniae*, 52 *E.coli*, 47 *Enterobacter spp.* izolatında fenotipik ve genotipik yöntemlerle karbapenem direnci ve bu dirençten sorumlu karbapenemaz enzimleri araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmada aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

1. Çalışmamızda *Enterobacteriaceae* üyesi izolatlar en sık pediatri bölümü başta olmak üzere dahili birimlerden, (%54) ve idrar örneklerinden (%45,6) izole edilmiştir.

2. Çalışmaya dahil edilen *K.pneumoniae* suşlarının %23,9'unda, *E.coli* suşlarının %13,5'inde, *Enterobacter spp.* suşlarının %12,8'inde ertapenem, imipenem veya meropenemden en az birine direnç ya da azalmış duyarlılık saptanmıştır. Suşların tümünde karbapenemlere direnç oranı %19,4 olarak tespit edilmiştir.

3. Çalışmamızda 237 *Enterobacteriaceae* izolatında, karbapenemaz enzimlerinin varlığını fenotipik olarak saptamak amacı ile CLSI önerileri doğrultusunda sınıf A karbapenemazlar için boronik asit testi, sınıf B karbapenemazlar için MHT ve MBL-E test yapılmıştır. Boronik asit testi ile suşların hiçbirinde pozitiflik saptanmamıştır. MHT ile karbapenem dirençli suşların %39,1'inde pozitiflik saptanırken, MBL E test ile %58,5'inde pozitiflik saptanmıştır.

4. *K. pneumoniae* suşlarında fenotipik olarak MBL-E test ile pozitif bulunan 21 izolat genotipik olarak 6 (%28,6) *bla_{IMP}*, 12 (%57,2) *bla_{VIM}*, 1 (%4,8) *bla_{NDM}*, gen bölgeleri; MHT ile pozitiflik saptanan 16 izolat, genotipik olarak 9 (%56,2) *bla_{IMP}*,

11(%68,7) *bla*_{VIM} saptanmıştır. *Enterobacter spp.*'de 3 suş MBL-E test ile pozitif bulunmuştur ve bu suşlar genotipik olarak 2 (%66,6) *bla*_{VIM}, 1 (%33,3) *bla*_{IMP} gen bölgeleri; MHT ile 3 suş pozitif saptandı ve genotipik olarak 2 (%66,6) *bla*_{VIM}, 1 (%33,3) *bla*_{IMP} gen bölgeleri belirlenmiştir. *E.coli* izolatlarında fenotipik ve genotipik olarak karbapenemaz saptanmamıştır. Bu sonuçlara göre fenotip saptama yöntemleri karşılaştırıldığında MBL-E testin daha duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

5. Genotipik olarak izolatlarda karbapenemaz enzimlerinden KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48, OXA-58 tipi karbapenemazları kodlayan gen bölgeleri moleküler yöntemlerle araştırılmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatların hiçbirinde OXA-58 ve KPC gen bölgesinin varlığı gözlenmemiştir. Suşların %11'inin OXA-48, %8,9'unun VIM, %4,7'sinin IMP, %0,4'ünün NDM genine sahip olduğu saptanmıştır.

6. PZR ile NDM gen bölgesi belirlenen *K. pneumoniae* suşunun sekans analizi yapılmış ve ilgili gen bölgesinin NDM-1 olduğu doğrulanmıştır. Bu bölgemizden bildirilen ilk NDM-1 karbapenemazdır.

7. Karbapenem direnci özellikle yoğun bakımlarda önem kazanmıştır. Direnç yayılımının engellenmesi için enfeksiyon hastalıklarına yönelik kontrol önlemlerinin alınması, ampirik tedaviye bölgesel ya da ulusal sürveyans verilerine göre karar verilmesi, antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre primer ilaçlarla tedaviye başlanması ve direnç gelişimi açısından tedavi sürecinin antimikrobiyal duyarlılık testi ile izlenmesi gibi tedbirler alınması gereklidir.

8. Antibiyotik direnç durumlarının belirlenmesi ile antibiyotiklerin daha doğru ve etkin şekilde seçilmesi sağlanabilecek ve doğru planlanmış tedavi ile süreç azaltılmış olacak, böylece ekonomik kaybın da önüne geçilebilecektir.

9. Doğru karbapenemin gerçek endikasyonda, uygun karbapenem, doğru dozaj ve sürede, doğru uygulama şekliyle optimizasyonu sağlanarak gereksiz kullanımının

sınırlandırılması tartışılmalı, aksi takdirde direnç sorununun yayılımı kaçınılmaz bir sonuç olacaktır.

10. Kullanımdaki antibiyotiklerin direnç sorunu nedeniyle etkisinin azaldığı, dirençli bakterilere etkili yeni antimikrobiyal geliştirme çabalarının sonuçsuz kaldığı günümüz dünyasında, global bir sorun haline gelen karbapenem direncinin önüne geçilebilmesi için dirençten sorumlu mekanizmaların anlaşılması gereklidir. Bu nedenle direnç mekanizmalarını aydınlatmaya yönelik daha kapsamlı ve daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir.

ÖZET

***Enterobacteriaceae* Üyelerinde Karbapenem Direnci ve Dirençten Sorumlu Enzimlerin Varlığının Araştırılması**

Karbapenemler çoklu ilaç dirençli gram negatif bakteri enfeksiyonlarında önemli bir tedavi seçeneği olarak kabul edilmektedirler. Ancak, günümüzde karbapenemleri hidrolize eden enzimlerin görülmesiyle birlikte karbapenemlerin antimikrobiyal etkinlikleri azalmıştır. Karbapenemazlar en güçlü hidrolitik aktiviteye sahip beta-laktamazlardır. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncinden en sık KPC, OXA-48, OXA-58 karbapenemazlar ve VIM, IMP, NDM gibi metallo-beta-laktamazların sorumlu olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada enfeksiyon etkeni olarak en sık izole edilen üç *Enterobacteriaceae* üyesinde karbapenemaz gen bölgelerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışma Ocak 2012 ve Aralık 2012 tarihleri arasında Afyon Kocatepe Üniversitesi Hastanesi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışma süresince, çeşitli klinik örneklerden izole edilen, 138 *Klebsiella pneumoniae*, 52 *Escherichia coli* ve 47 *Enterobacter spp.* olmak üzere *Enterobacteriaceae* üyesi toplam 237 ait suş çalışmaya dahil edilmiştir. Karbapenemlerden herhangi birine direnç ya da azalmış duyarlılık gösteren klinik izolatlarda sorumlu gen bölgeleri araştırılmıştır. Bakteri tanımlanması ve antibiyotik testleri, geleneksel yöntemler ve otomatize sistemle (Phoenix100, Becton Dickinson Co, Sparks, MD, ABD) gerçekleştirilmiştir. KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-58 ve OXA-48 karbapenemazları kodlayan gen bölgeleri Polimeraz zincir reaksiyon yöntemi (PZR) kullanılarak araştırılmıştır.

Suşlar, pediatri kliniği başta olmak üzere dahili tıp birimlerinde yatarak tedavi gören hastalardan (% 75) ve idrar (n=108), yara (n=48), kan (n=43), trakeal aspirat (n=23) ve balgam (n=15) örneklerinden izole edilmiştir. İzolatların % 19'unda (33

K. pneumoniae, 7 *E. coli* ve 6 *Enterobacter spp.*) ertapenem, imipenem ve meropenemden en az birine direnç veya azalmış duyarlılık tespit edilmiştir. Karbapenem dirençli izolatların %89'unda, karbapenemaz kodlayan genlerden en az birinin varlığı saptanmıştır.

Karbapenemaz kodlayan genlerden en sık *bla*_{OXA-48} gözlenmiştir (21 *K.pneumoniae*, 2 *E.coli*, 3 *Enterobacter spp.*). Bunu takiben diğer genler *bla*_{VIM} (21 *K.pneumoniae*, 2 *Enterobacter spp.*), *bla*_{IMP} (10 *K.pneumoniae*, 1 *Enterobacter spp.*) ve *bla*_{NDM-1} (1 *K. pneumoniae*) şeklinde belirlenmiştir. Suşların hiçbirinde KPC ve OXA-58 genleri gözlenmemiştir. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin dünya çapındaki yayılımı, bu suşlarla oluşan enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin oldukça sınırlı olması nedeniyle evrensel boyutta önemli bir sağlık sorununu oluşturmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları karbapenem direncinin özellikle *K.pneumoniae* suşlarında daha yüksek bulunduğu ve karbapenem direncinden sorumlu primer enzimin OXA-48 olduğu ancak metallo-beta-laktamazlarında oldukça sık saptandığını göstermiştir. Bu bulgulara ilaveten hastanemizde ilk kez NDM-1 karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatı tanımlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*, karbapenemler, direnç.

SUMMARY

Investigation of Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae* Species and the Presence of the Enzymes Responsible from Resistance

Carbapenems admitted as a significant treatment choose in multi-drug resistant gram-negative bacteria infections. Unfortunately nowadays antimicrobial effectivity of carbapenems gradually have decreased with showing up enzymes which hydrolyze carbapenems. Carbapenemases are β -lactamases have the most powerfull hydrolytic activity. It is reported that carbapenemases KPC, OXA-48, OXA-58 and metallo- β -lactamases as VIM, IMP, NDM are responsible for carbapenem resistance in members of the *Enterobacteriaceae* mostly. In the study it was aimed to investigate carbapenemases gene region responsible for production of carbapenemase enzymes in three members of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* which commonly isolated as infection agents.

The study was performed at Afyon Kocatepe University Hospital between the dates January 2012 and December 2012. A total of 237 strains member of *Enterobacteriaceae*, including 138 *Klebsiella pneumoniae*, 52 *Escherichia coli* and 47 *Enterobacter spp.* isolated from various clinical samples were collected during the study period. Clinical isolates that showed decreased susceptibilty or resistance to any of carbapenem were investigated. Identification of the bacteria and antibiotic susceptibility tests were performed by conventional methods and automated system (Phoenix100, Becton Dickinson Co, Sparks, MD, USA). Polymerase chain reaction (PCR) method were use to detection of the KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-58 and OXA-48 gene regions encoding carbapenemase.

Strains were isolated from inpatients (75 %) from internal medicine departments, especially from pediatriy clinic and isolated from urine samples

(n=108), wounds (n=48), blood (n=43), endotracheal aspirates (n=23) and sputum (n=15). Resistance or decreased susceptibility to at least one of ertapenem, imipenem and meropenem were detected in 19 % of isolates (33 *K. pneumoniae*, 7 *E. coli* ve 6 *Enterobacter spp.*). The presence of at least one of gene encoding carbapenemases were detected in 89 % of carbapenem resistant isolates. *bla*_{OXA-48} was the most common genes encoding carbapenemase (in 21 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli* and 3 *Enterobacter spp.* strains). The other genes were following that *bla*_{VIM} (19 *K. pneumoniae*, 2 *Enterobacter spp.*), *bla*_{IMP} (10 *K.pneumoniae*, 1 *Enterobacter spp.*) and *bla*_{NDM-1} (1 *K.pneumoniae*), respectively. The presence of KPC and OXA-58 genes were not observed in any of isolates.

The worldwide spread of *Enterobacteriaceae* expressing carbapenemases represents a major important treat of global health concern, because therapeutic options are very limited in infections cause by these carbapenemase producers. So defining carbapenem resistant strains is the primary important subject. The results of this study indicate that carbapenem resistance are higher especially in *K.pneumoniae strains* and OXA-48 was primarily responsible enzymes from carbapenem-resistance, but also it was determined that metallo- β -lactamases were frequent. In addition of these findings NDM-1 carbapenemase producing *K.pneumoniae* strain was isolated firstly and resistance gene was defined.

Key Words: *Enterobacteriaceae*, carbapenemases, resistance.

KAYNAKLAR

AKÇAY, SS. INAN, A. CEVAN, S. ÖZAYDIN, NO. COBANOĞLU, N. OZYÜREK, ÇS. AKSARAY, S. (2014). Gram negative bacilli causing infections in an intensive care unit of a tertiary care hospital in İstanbul, Turkey. *Journal Infect Dev Ctries.*, 8(5), 597-604.

AKTAŞ, Z. KAYACAN, CB. SCHNEİDER, I. CAN, B. MIDILLI, K. BAUERNFEİND, A. (2008). Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persist in *K.pneumoniae* in İstanbul, Turkey. *Chemotherapy*; 54(2): 101-6.

ALBAYRAK, GT. (2008). Hastane İnfeksiyonu Etkeni Olan *Pseudomonas Aeruginosa* Kökenlerinde Çift Disk Sinerji Testi ve Kombine Çift Disk Sinerji İle Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. Uzmanlık Tezi. Sağlık Bakanlığı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul.

ALHAN, E. (2011). Yeni karbapenemler. *J Pediatr Inf.* 25(Suppl 1); 90-94.

ALIŞKAN, HE. ÇOLAKOĞLU, Ş. BOSTANOĞLU, E. TURUNÇ, T. GÖÇMEN, JS. (2011). İki yıllık süreçte yapılan modifiye hodge testi sonuçlarının irdelenmesi. *Ankem Derg.*, 25(3): 169-172.

AL-MUHTASEB, M. KAYGUSUZ, A. (2008). Kan kültürlerinden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı, *Ankem Derg.*;22(4): 175-182.

ALP, E. PERÇİN, D. ÇOLAKOĞLU, S. DURMAZ, S. KÜRKCÜ, CA. EKİNCİOĞLU, P. GÜNEŞ, T. (2013). Molecular Characterization of carbapenem-resistant *K.pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *Journal of Hospital Infection*; (84):178-180.

ALTINDIŞ, M. KILIÇ, A. BAYSALLAR, M. (2014). Karbapenemaz genlerinin(KPC, NDM, VIM, NDM) hızlı tanısı. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-41, 163.

AMYES, SGB. (1997). Carbapenemases. ANKEM Derg, 11(2); 221-225.

ANDERSON, KF. L.D., RASHEED, JK. (2007). Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. Journal of clinical microbiology, 45 (2723).

ANĞ, Ö. AĞAÇFİDAN, A. BADUR, S. BOZKAYA, E. BORAL, BÖ. DERBENTLİ, Ş. ERTURAN, Z. KÜÇÜKER, MA. UZUN, M. YEĞENOĞLU, Y. (2010). Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü, Anğ Ö. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 175-180.

ARAL, M. KİREÇCİ, E. DOĞAN, ŞS. (2011). İdrar örneklerinden izole edilen grm negatif bakteriler ve antibiyotiklere direnç oranlarının retrospektif olarak değerlendirilmesi. Türk Mikrobiyol. Cem. Derg., 41(49), 139-142.

AŞIK, G. ER, H. ŞAHİN, M. ÜNAL, Z. DEMİRÖRS, A. ALTINDIŞ, M. (2012). *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında OXA-48 geninin varlığının araştırılması. 10. Antimikrobik kemoterapi günleri kitabı, İstanbul, P16.

AŞIK, G. KEŞLİ, R. DEMİR, C. YOLDAŞ, Ö. ÇETİNKAYA, Ö. (2014). Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının genotipik özelliklerinin araştırılması. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-43, 165.

AYTAR, AA. ÇALIŞKAN, E. GÜVEN, BG. KAŞ, E. (2014). Kan Kültürlerinden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve bazı antibiyotiklere direnç oranları. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-21, 138.

BAROUD, M. DANDACHE, I. ARAJ, GF. WAKİM, R. KANJ, S. KANAFANİ, Z. KHAİRALLAH, M. SaBRA, A. SHEHAB, M. DBAİBO, G. MATAR, GM. (2013). Underlying mechanisms of

carbapenem resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing *K.pneumoniae* ve *E.coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. International Journal of Antimicrobial Agents; (41), 75-79.

BILGEHAN, H. (2004). Klinik Mikrobiyoloji Tanı. *Enterobacteriaceae*. Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi. İzmir, 425-54.

BİÇMEN, M. SARI, A. GÜLAY, Z. (2012). OXA-48 karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin klonal ilişkilerinin araştırılması. 10. Antimikrobik kemoterapi günleri kitabı, İstanbul, P48.

BOU, G. OLİVER, A. MARTİNEZ-BELTRAN, J. (2005). OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. Antimicrobial agents and chemotherapy, 44 (6), 1556-1561.

BOZKAYA, E. (2005). Tıbbi Mikrobiyoloji-2. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 51-70. (İstanbul Üniv. Tıp Fakültesi, Temel ve Klinik Bilimler Ders Kitapları). Bölüm yazarı Berkiten, R)

BRADFORD, PA. (2004). Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical microbiology reviews, 14 (4): 933-951.

BRADFORD, PA. URBAN, C. MARIANO, N. PROJAN, SJ. RAHAL, JJ. BUSH, K. (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. Antimicrobial agents and chemotherapy, 41 (3), 563-69.

BRATU, S. M.M, NİCHANİ, S. et al. (2005). Emergence of KPC-possesing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49 (3018).

BROOKS, GF. CAROLL, KC. BUTEL, JS. MORSE, SA. (2010). Tıbbi Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü, YENEN, SO. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 142-158.

BUSH K. (2010). Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistance *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Infect Dis*; (13): 558-64.

CANTON, R. AKOVA, M. CARMELI, Y. GÍSKE, CG. GLUPCZYNSKI, Y. GNIADKOWSKI, M. LÍVERMORE, DM. MÍRIAGOU, V. NAAS, T. ROSSOLINI, GM. SAMUELSEN, Q. SEIFERT, H. WOODFORD, N. NORDMANN, P. (2012). Rapid Evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe: *Clinical Microbiology and Infection*; 18(5): 413-431.

CARRER A. POÍREL, L. ERAKSOY, H. ÇAĞATAY, A. BADUR, S. NORDMANN, P. (2008). Spread of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in İstanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*; 52(8): 2950-4.

CDC, C.f.D.C.a.P. (2010). Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo-beta-lactamase United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59 (750).

CDC, C.f.D.c.a.P. (2011). Update: detection of a verona integron-encoded metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* United States. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 59 (1212).

CHANG, H.J., HSU, P.C., YANG, C.C., KUO, A.J., CHIA, J.H., WU, T.L. (2011). Risk factors and outcomes of carbapenem-nonsusceptible *Escherichia coli* bacteremia: a matched case-control study. *Journal of microbiology, immunology, and infection. Wei mian yu gan ran za zhi*, 44 (2), 125-130.

CLÍNICAL and LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. (2012) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document M100-S20, CLSI, Wayne PA.

COHEN, S.J. LEVERSTEIN, VH, MA. (2010). Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 36(3):205-10.

CRESPO, MP. WOODFORD, N. SINCLAIR, A. KAUFMANN, ME. TURTON, J. GLOVER, J. (2004) Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel

metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. Journal of clinical microbiology, 42 (11), 5094-5101.

ÇALANGU, S. (2003). Yeni bir karbapenem: Ertapenem. ANKEM Derg, 17(3): 260-262.

ÇALIŞKAN, E. AYTAR, AA. GÜVEN, BG. KAŞ, E. DEDE, A. (2014). Toplum kaynaklı üriner sistem enfeksiyonuna neden olan *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç oranlarının ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz varlığının araştırılması. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-23, 140.

ÇİFTÇİ, İH. KARAKEÇE, E. AŞIK, G. DEMİRAY, T. ER, H. (2013). Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması. Ankem Derg; 27(2): 49-54.

DESHPANDE, P. SHETTY, A. KAPADIA, F. HEDGE, A. SOMAN, R. Rodrigues, C. (2010). New Delhi metallo 1: have carbapenems met their doom? Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 51 (10), 1222.

DOĞANTEKİN E. (2010). Gram negatif basillerde tigesiklinin invitro aktivitesinin incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Elazığ.

DOYLE, D. PEIRANO, G. LASCOLS, C. LLOYD, T. CHURCH, DL. PITOUT, JDD. (2012). Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. Journal of Clinical Microbiology; 50(12): 3877-80.

DREW, RJ. TURTON, JF. HILL, RLR. LİVERMORE, DM. WOODFORD, N. PAULUS, S. CUNLIFFE, NA. (2013). Emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a UK paediatric hospital. Journal of Hospital Infection; 84: 300-304.

DUMAN, Y. KUZUCU, Ç. ÇUĞLAN, SS. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen bakteriler ve antimikrobiyal duyarlılıkları, Erciyes Tıp Derg, 33(3): 189-196.

ENDİMİANİ, A. PEREZ, F. BAJAKSOUZİAN, S. WİNDIAU, AR. GOOD, CE. CHOUDHARY, Y. HUIER, AM. BETHEL, CR. BONOMO, RA. JACOBS, MR. (2010). Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. J Clin Microbiol. 48(12):4417-25.

ESER, KÖ. ULUDAĞ, HA. ERGİN, A. BORAL, B. ŞENER, B. HASÇELİK, G. (2014). İnvazif enfeksiyonlara neden olan GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenem direnci. Mikrobiyol Bul., 48(1), 59-69.

FARRA, A. et al. (2008). Role of outer membrane protein OprD and penicillin-binding proteins in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem and meropenem. Int J Antimicrob Agents, 31(5): 427-33.

FONTANA, C. FAVARO, M. SARMATI, L. NATOLİ, S. ALTIERİ, A. BOSSA, MC. MİNELLİ, S. LEONARDİS, F. FAVALLİ, C. (2010). Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. BMC research notes; 3: 40.

FRANKLİN, C. LİOLİOS, L. PELEG, AY. (2006) Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacilli in the clinical laboratory. Journal of clinical microbiology, 44 (9), 3139-3144.

FRASER, L. S., ARNETT, M., SİNAVE, P.C. (2009). *Enterobacter* Infections, e medicine from WebMD.

GACAR, GG. MİDİLLİ, K. KOLAYLI, F. ERGEN, K. GUNDES, S. HOSOGLU, S. KARADENİZLİ, A. VAHABOGLU, H. (2005). Genetic and Enzymatic Properties of Metallo-β-Lactamase VIM-5 from a Clinical Isolate of *Enterobacter cloacae*. Antimicrob. Agents Chemother.; 49(10): 4400-4403.

GALANİ, I. REKATSİNA, PD. HATZAKİ, D. PLACHOURAS, D. SOULİ, M. GİAMARELLOU, H. (2008). Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 61 (3), 548-553.

GAO, J. ZHAO, X. BAO, Y. RUIHUA, M. ZHOU, Y. XINXIAN, L. TONGJIE, C. YUMEI, C. (2013). Antibiotic resistance and OXA-type carbapenemases-encoding genes in airborne *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wards. JBurns-4064, 5.

GELMEZ, GA. KARAASLAN, A. ÖZSOY, S. KAYA, M. KEPENEKLİ, E. SOYSAL, A. BAKIR, M. SÖYLETİR, G. (2014). Rektal sürüntü örneklerinde karbapenem dirençli mikroorganizmaların saptanmasında farklı tarama yöntemlerinin değerlendirilmesi. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-86, 217.

GİANİ, T. PİNİ, B. ARENA, F. CONTE, V. BRACCO, S. MİGLİAVACCA, R. the AMCLI-CRE Survey Participants. PANTOSTİ, A. PAGANİ, L. LUZZARO, F. ROSSOLİNİ, GM. (2013). Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. Surveillance and outbreaks reports.

GİRLİCH, D. BOUİHAT, N. POİREL, L. BENOUDA, A. NORDMANN, P. (2013). High rate of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at a University hospital in Morocco. Clin Microbiol Infect, 5.

GİRLİCH, D. HALİMİ, D. ZAMBARDİ, G. NORDMANN, P. (2013). Evaluation of E-test strips for detection of KPC and metallo-carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.

GUEMBE, M. CERCENADO, E. ALCALA, L. MARİN, M. INSA, R. BOUZA, E. (2008). Evolution of antimicrobial susceptibility patterns of aerobic and facultative gram-negative bacilli causing intra-abdominal infections: results from the SMART studies 2003-2007. Rev Esp Quimioter, 21(3):166-173.

GUR, D. HASÇELİK, G. AYDIN, N. TELLİ, M. GÜLTEKİN, M. OĞUNÇ, D. ARIKAN, OA. UYSAL, S. YAMAN, A. KİBAR, F. GULAY, Z. SUMERKAN, B. ESEL, D. KAYACAN, CB. AKTAŞ, Z. SÖYLETİR, G. ALTINKANAT, G. DURUPINAR, B. DARKA, O. AKGÜN, Y. YAYLA, B. GEDİKOĞLU, S. SİNİRTAS, M. BERKTAS, M. YAMAN, G. (2009). Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. Jchemother, (21), 383-9.

GÜLAY, Z. (2005). Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. Ankem derg, 19(Ek-2), 66-77.

GÜLAY, Z. (2014). “Karbapenemazların başarısı: plazmidler ve klonlar”. 11. Antimikrobik kemoterapi günleri program ve bildiri özeti kitabı. 18-22. Nisan, İstanbul.

GÜR D. (1997). Hastane Enfeksiyonlarında önem kazanan gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, (1):38-45.

HAMANÇA, Ö. (2009). *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde OXA tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp fakültesi, Mikrobiyoloji, İstanbul.

HAWKEY, PM. XİONG, J. YE, H. LI, H. M'ZALİ, FH. (2001) Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People's Republic of China. FEMS microbiology letters, 194 (1), 53-57.

HERBERT, S. HALVORSEN, DS. LEONG, T. FRANKLİN, C. HARRINGTON, G. SPELMAN, D. (2007) Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo- beta -lactamase gene blaIMP-4 at a 320-bed tertiary hospital in Australia. Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America, 28 (1), 98-101.

HİRAKATA, Y. IZUMİKAWA, K. YAMAGUCHİ, T. TAKEMURA, H. TANAKA, H. YOSHIDA, R. (1998). Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-

resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrobial agents and chemotherapy, 42 (8), 2006-2011.

HO, J. TAMBYAH, PA. PATERSON, DL. (2010). Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective, Curr Opin Infect Dis; 23(6): 546-53

HOUANG, ET. CHU, YW. LO, WS. CHU, KY. CHENG, AF. (2003) Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (arr-2) and metallo-beta-lactamase (blaIMP-4) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. Antimicrobial agents and chemotherapy, 47 (4), 1382-1390.

HUJER, KM. HUJER, AM. HULTEN, EA. BAJAKSOUZIAN, S. ADAMS, JM. DONSKEY, CJ. (2006). Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter spp.* isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrobial agents and chemotherapy, 50 (12), 4114-4123.

IŞIK, F. (2007). Kan kültürlerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında geniş spektrumlu beta-laktamaz varlığının saptanmasında üç yöntemin (Çift Disk Sinerji, Kombine Disk ve E-test) karşılaştırılması ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. Uzmanlık Tezi, Selçuk Üniv. Meram Tıp Fak.

JACOBY, GA. MUNOZ-PRICE, LS. (2005). The new beta-lactamases. The New England journal of medicine, 352 (4): 380-391.

JEON, BC. JEONG, SH. BAE, IK. KWON, SB. LEE, K. YOUNG, D. (2005) Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 beta-lactamase in korea. Journal of clinical microbiology, 43 (5), 2241-2245.

JONES, RN. GÜRLER, N. CEPPARULA, M et al. (2014). Resistance surveillance program report for selected European isolates. Diagn Microbiol Infect Dis (78); 429-36.

KAASE, M. SZABADOS, F. WASSILL, L. GATERMANN, GS. (2012) Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a Commercial Multiplex PCR. J.Clin. Microbiol.;50(9): 3315-19.

KARAOĞLAN, I. ZER, Y. SÜNER, A. NAMIDURU, M. (2008). Bazı *Enterobacteriaceae* türlerine eritropenemin in vitro etkinliği. Ankem Derg, 22(4), 183-187.

KARATUNA, O. AKYAR, I. OKULLU, ÖS. ÜNÜBOL, N. KAYA, DE. GÜNGÖRÜRLER, E. KOCAGÖZ, S. KOCAGÖZ, T. (2014). *E.coli* ve *Klebsiella* kökenlerinde karbapenem direncine neden olan mekanizmaların araştırılması: NDM-1'in sessiz yayılımı. 11. Antimikrobik kemoterapi günleri program ve bildiri özeti kitabı. 27-28. Nisan, İstanbul.

KESKİN, K. ÖZSOY, FM. KOÇAK, N. ÇAVUŞOĞLU, Ş. ÇAKICI, N. ALTUNAY, H. YENEN, ŞO. (1998). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* şuşlarına karşı meropenemin etkinliği. Klimik Derg, 11(1): 26-29.

KHAN, AS. ANSCOMBE, IW. Cummings, KK. POPE, MA. SMİTH, LC. DRAGHİA-AKLİ, R. (2003). Effects of plasmid-mediated growth hormone-releasing hormone supplementation on LL-2 adenocarcinoma in mice. Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy, 8 (3), 459-466.

KİM, YS. SHİN, J. SHİN, SY, KO, SK. (2013). Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from Korea. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease; 76: 486-90.

KİRAZ, N. SAMASTI, M. AYGÜN, G. (2011). Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı Cilt-II. İstanbul Üni. Basım ve Yayınevi Müd. İstanbul, 887-916.

KOCSİS, E. SAVIO, C. PİCCOLİ, G. CORNAGLİA, G. MAZZARİOL, A. (2013). *Klebsiella pneumoniae* harbouring OXA-48 carbapenemase in a Libyan refugee in İtaly. Clinical Microbiology Infect: (19): E409-E411.

KOHLER, T. MÍCHEA-HAMZEHPUR, M, EPP, S.F. PECHERE, J.C. (1999). Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (2), 424-27.

KORTEN, V. ULUSOY, S. ZARAKOLU, P. METE, B. (2007). Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in turkey: results of the mystic program. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 59: 453-457.

KÖKSAL, F. SİREKBASAN, S. AK, K. KÜÇÜKBASMACI, Ö. SAMASTI, M. (2011). Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin prevalansı ve antimikrobiyal direnç patternleri. 39(1-2), 35.

KUMARASAMY, KK. TOLEMAN, MA. WALSH, TR. BAGARÍA, J. BUTT, F. BALAKRÍSHNAN, R. (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 10 (9), 597-602.

KUS, JV. ,BURROWS LL. (2007). *Infections due to Citrobacter and Enterobacter*. Elsevier Inc.

KUZUCU, Ç. YETKİN, F. GÖRGEÇ, S. ERSOY, Y. (2011). Genişlemiş spektrumlu bet-laktamaz üreten *Klebsiella spp.* ve *E.coli* suşlarının ertapenem ve diğer karbapenemlere karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Mikrobiyol Bul.*, 45(1), 28-35.

LAGATOLLA, C. EDALUCCI, E. DOLZANİ, L. RÍCCIO, ML., DE LUCA, F. MEDESSİ, E. ve diğerleri. (2006). Molecular evolution of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in a nosocomial setting of high-level endemicity. *Journal of clinical microbiology*, 44 (7): 2348-53.

LEE, EH. NÍCOLAS, MH. KÍTZÍS, MD. PÍALOUX, G. COLLATZ, E. GUTMANN, L. (1991). Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35 (6), 1093-98.

LEE, K. CHONG, Y. SHİN, HB. (2001). Modified Hodge test and EDTA synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter spp.*, Clin Microbiol Infect, (7):88-91.

LEE, K. LIM, YS. YONG, D. YUM, JH. CHONG, Y. (2003). Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double disk synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.*, J Clin Microbiol, 41(10):4623-9.

LİMBAGO, BM. RASHEED, JK. ANDERSON, KF. Zhu, W. KİTCHEL, B. WATZ, N. MUNRO, S. GANS, H. BANAEİ, N. KALLEN, AJ. (2011). IMP producing carbapenem-resistant *K.pneumoniae* in the United States. Journal of Clinical Mikrobiol Dec., 49(12), 4239-45.

LİVERMORE, DM. WOODFORD, N. (2000). Carbapenemases: a problem in waiting? Curr Opin Microbiol, 3(5): 489-95.

LYNCH, PJ. CLARK, MN. ZHANEL, GG. (2013). Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended spectrum β -Lactamases and carbapenemases). Expert Opin. Pharmacother, 14(2): 199-210.

MENDES, RE. CASTANHEİRA, M. GARCİA, P. GUZMAN, M. TOLEMAN, MA. WALSH, TR. JONES, RN. (2004). First isolation of *blaVIM-2* in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*; 48: 1433-1434.

MURRAY, PR. ROSENTHAL, KS. PFALLER, MA. (2009). Tıbbi Mikrobiyoloji. 6. Baskı. Çeviri Editörü: Başustaoğlu A. Atlas Kitapçılık. Ankara, 301-09, 313-14.

NAAS, T. NORDMANN, P. VEDEL, G. POYART, C. (2005) Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. Antimicrobial agents and chemotherapy, 49 (10), 4423-4424.

NORDMANN, P. NAAS CG. (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. Lancet infectious disease, (9): 228.

NORDMANN, P. POİREL, L. (2007). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 8 (6), 321-331.

ÖCAL, D. (2012). Gram negatif bakterilerde antibakteriyel direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi, *Ankem Derg*, 26(3):154-164.

ÖNCÜL, O. (2002). Antibiyotikler I. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. (31); 23-28.

ÖZDEMİR D. (2011). *Acinetobacter* enfeksiyonları: Direnç Epidemiyolojisi. 3. Türkiye EKMUD Bilimsel Platformu, İstanbul. 249-252.

ÖZKUYUMCU, C. DÜRDAL, US. SANCAK, B. ALP, A. SARIBAŞ Z, ÇAKAR, A. (2009). Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. *Enterobacteriaceae*. Editör: Özkuyumcu C. Güneş Kitabevi. Ankara, 103-121.

ÖZMEN E. (2013). Klinik örneklerden izole edilen gram negatif bakterilerde doripenem ve diğer karbapenemlerin in vitro etkinliklerinin karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Atatürk Üni. Tıp Fak. Tıbbi Mikro. AD.

ÖZMEN, E. GEYİK, MF. ULUĞ, M. ÇELEN, MK. HOŞOĞLU, S. AYAZ, C. (2010). Yatan hastalarda izole edilen gram negatif bakteriler ve antibiyotik dirençlerinin değerlendirilmesi, *Düzce Tıp Derg*, 12(3): 32-39.

PAGANİ, L. MİGLİAVACCA, R. PIAZZA, A. and MİRAGLIOTTA, G. (2013). Rapid and sensitive detection of blaKPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. *Springer plus*, 31(2), 5.

PATEL, JB. RASHEED, JK. KITCHEL, B. (2009) Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. *Clinical Microbiology Newsletter*. 31(8):55-62.

PELEG, AY. FRANKLIN, C. BELL, JM. SPELMAN, DW. (2005) Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 (11), 1549-1556.

POÏREL, L. MARQUÉ, S. HÉRITIER, C. SEGONDS, C. CHABANON, G. NORDMAN, P. (2005). OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*; P. 202–208.

POÏREL, L. NORDMANN, P. (2006) Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 12 (9), 826-836.

POÏREL, L. ÖZDAMAR, M. SOSA-OCAMPO, AA. TÜRKÖĞLU, S. ÖZER, UG. NORDMANN, P. (2012). NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Now in Turkey. *Antimicrob. Agents Chemother*; 56(5): 2784-2785.

POÏREL, L. WELDHAGEN, GF. DE CHAMPS, C. NORDMANN, P. (2002). A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49 (3): 561-65.

POTTUMARTHY, S. MOLAND, ES. JURETSCHKO, S. SWANZY, SR. THOMSON, KS.,FRITSCH, TR. (2003). NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerging infectious diseases*, 9 (8): 999-1002.

POURNARAS, S. IKONOMIDIS, A. TZOUVELEKIS, LS. TOKATLIDOU, D. SPANAKIS, N. MANIATIS, AN. LEGAKIS, NJ. TSAKRIS, A. (2005). VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo-

β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/ VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 5153-5156.

QUEENAN, AM. SHANG, W. SCHRECKENBERGER, P. LOLANS, K. BUSH, K. QUINN, J. (2006) SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50 (10): 3485-87.

QUEENAN, MA. BUSH, K. (2007). Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-58.

REW, H. (1989). Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram negative bacteria. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 27 (1), 93-99.

ROSSOLINI, GM. (2005). Acquired metallo-beta-lactamases: an increasing clinical threat. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 (11), 1557-1558.

RPZENFE'D, LG. (1980). The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289, 321-331.

SARI, H. (2005). Karbapenemlere dirençli Gram negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA/meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge test ile metallo-beta-laktamaz varlığının araştırılması Uzmanlık Tezi. Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul.

SCOULICA, EV. NEONAKIS, IK. GIKAS, AI. TSELENTIS, YJ. (2004) Spread of bla(VIM-1)-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the bla(VIM-1) metallo-beta-lactamase gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 48 (3), 167-172.

SIEVERT, DM. RICKS, P. EDWARDS, JR. et al. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*, (34)1–14.

TAŞOVA, Y. (2011). Gram negatif enterik bakteri infeksiyonlarının yönetimi, *Ankem Derg.*,25(2):33-44.

TENOVER, FC. KALSİ, RK. WILLIAMS PP, et al. (2006). Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging infectious diseases*, 12 (1209).

TİKVEŞLİ S. (2008). *K.pneumoniae* suşlarında CTX-M beta-laktamazların fenotipik ve moleküler tanımlanması. Uzmanlık Tezi. Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji, Denizli.

TOLEMAN, MA. SİMM, AM. MURPHY, TA. GALES, AC. BIEDENBACH, AC. JONES, RN. WALSH, TR. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673-679.

TOMASZ, AL. BANGURA, U. JIMMY, DH. ANSUMANA, R. LIZEWSKI, SE. LI, RW. STENGER, DA. TAİTT, CR. VORA, GJ. (2013). Identification of *bla*_{OXA-51-like}, *bla*_{OXA-58-like}, *bla*_{DIM-1}, *bla*_{VM} carbapenemase genes in hospital *Enterobacteriaceae* isolates from Sierra Leone. *Journal of Clinical Mikrobiology*; (51)7: 2435-38.

TOPÇU AW, SÖYLETİR, G. DOĞANAY, M. (2002). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Cilt-2. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, 1555-82.

TOSUN, Aİ. YILMAZ, M. ŞEN, H. SİREKBASAN, L. ŞAYLAN, GE. GÖKÇEAĞAÇLI, C. ÖZMEN, H. (2014). İdrar kültüründen izole edilen *Klebsiella spp.* ve *E.coli* kökenlerinin antibiyotik duyarlılıkları. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-46, 170.

TUNÇCAN, ÖG. TOZLU, KD. DİZBAY, M. HİZEL K. (2008). Hastane kaynaklı *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılığı. ANKEM Derg, (22):188-92.

TURTON, JF. WARD, ME. WOODFORD, N. KAUFMANN, ME. PİKE, R. LİVERMORE, DM. (2006). The role of ISAbal in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. FEMS microbiology letters, 258 (1), 72-77.

UNAT, EK. (1986). Tıp Bakteriyojisi ve Virolojisi. Dergah Tıp Yayınları. İstanbul, 609-10.

USTAÇELEBİ, Ş. MUTLU, G. İMİR, T. CENGİZ, AT. TÜMBAY, E. METE, O. Edit. (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Çeviri Editörü: Ustaçelebi Ş. Güneş Kitabevi. Ankara, 471-517.

WALSH, TR. TOLEMAN, MA. HRYNIEWICZ, W. BENNETT, PM. JONES, RN. (2003) Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europa: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. J Antimicrob Chemother; 52: 116-119.

WALSH, TR. TOLEMAN, MA. POİREL, L. NORDMANN, P. (2005) Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? Clinical microbiology reviews, 18 (2), 306-325.

WALTHER-RASMUSSEN, J. HOİBY, N. (2006). OXA-type carbapenemases. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 57 (3), 373-383.

WALTHER-RASMUSSEN, J. HOİBY, N. (2007). Class A carbapenemases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60 (3): 470-482.

WATANABE, M. IYOBE, S. INOUE, M. MİTSUHASHİ, S. (1991) Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 35 (1), 147-151.

WEBBER, MA. PİDDOCK, LJ. (2003). The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 51 (1); 9-11.

WOODFORD, N. EASTAWAY, AT. FORD, M. LENORD, A. KEANE, C. QUAYLE R.M. STEER, AJ. ZHANG, J. LİVERMORE D,M. (2010). 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; 48(8): 2999-3002.

WOODFORD, N. TIerno, P.M. YOUNG, K. TYSALL, L. PALEPOU, M.F. WARD, E. (2003). Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. Antimicrobial agents and chemotherapy, 48 (12), 4793-99.

WOODFORD, N. TURTON, JF. LİVERMORE, DM. (2011). Multiresistant gram negative bacteria: the rol of high risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev (35); 35-736.

YAN, JJ. HSUEH, PR. KO, WC. LUH, KT. TSAİ, SH. WU, HM. (2001). Metallo-beta-lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45 (8), 2224-2228.

YAN, JJ. KO, WC. TSAİ, SH. WU, HM. WU, JJ. (2001) Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying bla(IMP-8) in a university medical center in Taiwan. Journal of clinical microbiology, 39 (12), 4433-4439.

YANG, Q. WANG, H. SUN, H. CHEN, H. YİNGCHUN XU, CHEN, M. (2010). Phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacteriaceae* with decreased susceptibility to carbapenems: results from large hospital-based surveillance studies in China. Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 54(1): 573-7.

YANIK, K. EMİR, D. EROĞLU, C. KARADAĞ, A. GÜNEY, AK. GÜNAYDIN, M. (2013). Karbapeneme dirençli gram-negatif izolatlarda New Delhi Metallo-Beta-Laktamaz-1 (NDM-1) varlığının PCR ile araştırılması. Mikrobiyol Bul; 47(2): 382-384.

YAZGAN, AS. (2010). *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter aerogenes* türlerinden elde edilen lipopolisakkarit yapısındaki endotoksinlerin bazı hastane enfeksiyonları üzerine etkileri. Uzmanlık Tezi, Gebze Yüksek Teknoloji Enst., Mühendislik ve Fen Bilimleri Enst., Biyoloji AD.

YAZICI, V. BOZDOĞAN, B. BALCI, C. (2013). Türkiye’de Bir Eğitim ve Araştırma Hastanesinde izoleedilen *Klebsiella pneumoniae* türlerinde karbapenem direnç genlerinin dağılımı. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Program ve Bildiri Özeti Kitabı. İstanbul, PP-38, 160.

YILMAZ, N. AĞUŞ, Nİ. KÖSE, Ş. YURTSEVER, SG. ÖNER, Ö. (2009). Geniş spektrumlu beta-laktamaz salgılayan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg., 39(3-4),80-84.

YİĞİT, H. QUEENAN, AM. ANDERSON, GJ. DOMENECH-SANCHEZ, A. BIDDLE, JW., STEWARD, CD. ve diğerleri. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial agents and chemotherapy, 45 (4): 1151-61.

YONG, D. TOLEMAN, MA. GİSKE, CG. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *K.pneumoniae* sequence type 14 from India, Antimicrob Agents Chemother; 53(12): 5046-54.

YUM, JH. YI, K. LEE, H. YOND, D. LEE, K. Kim, MJ. ROSSOLİNİ, GM. CHONG, Y. (2002). Molecular characterization of metallo- β -lactamase producing *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter* genom species 3 from Korea: Identification of two new integrons carrying the bla_{VIM-2} gene cassettes. The Journal of antimicrobial chemotherapy, (49), 837-40.

YURTSEVER, S. KURULTAY, N. ÇEKEN, N. YURTSEVER, Ş. AFŞAR, İ. ŞENER, AG. YILMAZ N. (2009). Yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi, Ankem Derg, 23(1): 34-38.

ÖZGEÇMİŞ

Adı soyadı : Aslı BULUT
Doğum tarihi : 08 Kasım 1988
Doğum yeri : Gediz/Kütahya
Yabancı Dil : İngilizce
e-mail : aslim_bulut@hotmail.com

ÖĞRENİM

Yüksek Lisans (2011-2014) Afyon Kocatepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi - Tıbbi Mikrobiyoloji AD.

Üniversite (2007-2011) Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji

Lise (2002-2005) Sait Sabri Ağaoğlu Lisesi