

T.C.
TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL
ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

Tez Yöneticisi

Prof. Dr. Nuri KİRAZ

KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ENTEROBACTERIACEAE*
TESPİTİNDE KULLANILAN FENOTİPİK TESTLERİN
ETKİNLİKLERİNİN PROSPEKTİF OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr. Betül GÜNAYDIN

TEKİRDAĞ-2022

TEŞEKKÜR

Tezimin oluşmasında emekleri bulunan tez danışmanım, anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a, uzmanlık eğitimim süresince bilgisini cömertçe sunan Doç. Dr. Birol ŞAFAK'a, asistanlıktan çok daha fazlasını sevgiyle öğreten Prof. Dr. Dumrul GÜLEN'e, her anımda yanımda olan Arş. Gör. Dr. Mine AYDIN KURÇ'a, desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. Hülya DURAN'a;

Hep güzel anılarla hatırlayacağım, birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum çok sevgili çalışma arkadaşlarıma;

Bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan annem Nevin GÜNAYDIN, babam Zafer GÜNAYDIN ve kardeşlerim Eslem-Ahsen GÜNAYDIN'a cân-u gönülden teşekkür ederim.

Dr. Betül GÜNAYDIN

Tekirdağ, 2022

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGE VE KISALTMALAR.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER.....	3
ENTEROBACTERİACEAE AİLESİ.....	3
Morfolojik Yapısı	4
Kültür Özellikleri.....	4
Biyokimyasal Özellikleri.....	5
Antijenik Yapısı.....	7
Taksonomi	8
Patogenez ve İmmunite	11
Laboratuvar Tanısı.....	13
Klinik Hastalıklar	13
Tedavi.....	14
ANTİBAKTERİYEL İLAÇLAR	15
Beta Laktam Grubu Antibiyotikler.....	15
ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI	19
Beta Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	20
KARBAPENEM DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	22
Sınıf A Karbapenemazlar	23
Sınıf B Karbapenemazlar	24
Sınıf D Karbapenemazlar	24
KARBAPENEM DİRENCİNİN VE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ TESPİTİ	25
Karbapenemazların Fenotipik Yöntemlerle Tespiti	26
Karbapenemazların Genotipik Yöntemlerle Tespiti.....	28
GEREÇ VE YÖNTEMLER	30
ETİK KURUL ONAYI VE PROJE DESTEĞİ.....	39
ÇALIŞMANIN ÖRNEKLEMİ.....	30

KLİNİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, ENTEROBACTERİCEAE TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI	30
İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI.....	31
FENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	32
Kombine Disk Metodu	32
Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) ve Türevleri.....	33
GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	38
İSTATİSTİKSEL ANALİZ	39
BULGULAR	40
TARTIŞMA.....	51
SONUÇ.....	58
ÖZET	59
KAYNAKLAR.....	63
EKLER	70

SİMGE VE KISALTMALAR

ABC	: ATP binding cassette
aCIM:	: Carbapenem Inactivation Method with ammonium bicarbonate
ATCC	: American Type Culture Collection
ATP	: Adenozin trifosfat
BAP	: Bilimsel Araştırma Projesi
bCIM	: Carbapenem Inactivation Method with phenylboronic acid
BCT	: Blue Carba Testi
BO	: Boronik asit
CAESAR	: Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CCUG	: Culture Collection University of Gothenburg
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CIM	: Carbapenem Inactivation Method
CL	: Kloksasilin
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
ÇİD	: Çoğul İlaç Dirençli
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPA	: Dipikolinik asit
dUTP	: Deoksi üridin trifosfat
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
eCIM	: Carbapenem Inactivation Method with ethylenediaminetetraacetic acid
ED	: Etilendiamintetraasetik Asit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EMB	: Eosin Methylene Blue
EUCAST	: European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing
GES	: Guiana extended spectrum
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
HEA	: Hekton Enterik Agar
IMI	: Imipenem hydrolyzing β -lactamase
IMP	: Imipenemase metallo beta lactamase
KDE	: Karbapenem Dirençli <i>Enterobacteriaceae</i>
KIA	: Kliger's Iron Agar
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MALDI TOF MS	: Matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry
MATE	: Multidrug and toxic compound export
MBL	: Metallobetalaktamaz
mCIM	: Modified Carbapenem Inactivation Method
MFS	: Major facilitator super family
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MİK	: Minimal İnhibitör Konsantrasyon
MLST	: Multilokus sekans tipleme

NCTC	: National Collection of Type Cultures
NDM	: New Delhi metallo beta lactamase
ONPG	: <i>o</i> -Nitrofenil- β -D-galaktopiranosid
OXA	: Oksasilinaz
PBA	: Phenylboronic acid
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Protein
PEGN	: Poly Ethylene Glycol + Azide
PFGE	: Pulsed field gel electrophoresis
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
qPCR	: Quantitative Polimerase Chain Reaction
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit
SFC	: <i>Serratia fonticola</i> carbapenemase
SME	: <i>Serratia marcescens</i> enzyme
SMR	: Staphylococcal Multiple Resistance
SS	: Salmonella Shigella
STL-B	: Stool Tris Lysis Buffer
TMO	: Temosilin
TSB	: Tryptic Soy Broth
TSI	: Triple Sugar Iron
VIM	: Verona integron encoded metallo beta lactamase
WB	: Wash Buffer
WHO	: World Health Organization
XLD	: Xylose Lysine Deoxycholate

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Enterobacteriaceae ailesinin taksonomisi (Koneman 7. Baskısından kısaltılarak hazırlanmıştır) (16).....	8
Tablo 2: Penisilinler ve etki spektrumları (15).....	17
Tablo 3: Sefalosporinler, Sefamisinler ve etki spektrumlarına bazı örnekler (15).....	18
Tablo 4: Karbapenemler ve Monobaktam (15)	19
Tablo 5: Karbapenemazların sınıflandırması (25-28)	23
Tablo 6: Kombine disk testi sonuçlarının yorumlanması	32
Tablo 7: mCIM testi sonuçlarının yorumlanması (45)	34
Tablo 8: aCIM sonuçlarının yorumlanması	34
Tablo 9: eCIM sonuçlarının yorumlanması (45)	35
Tablo 10: İzolatların yıllara göre dağılımı.....	40
Tablo 11: İzolatların numune türlerine göre dağılımı	41
Tablo 12: İzolatların genotipik karbapenemaz direnç profilleri	42
Tablo 13: Kombine disk yöntemine göre direnç profili dağılımı.....	43
Tablo 14: mCIM ve aCIM yöntemlerinin farklı değerlendirme yöntemlerine göre sonuçları .	44
Tablo 15: Karbapenemaz tespiti açısından çalışılan fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük sonuçları	45
Tablo 16: Kombine disk yönteminin karbapenemaz türünün tespiti açısından duyarlılık ve özgüllük sonuçları	46
Tablo 17:Farklı direnç genlerinin eCIM (19mm) testine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları	47
Tablo 18: Farklı direnç genlerinin eCIM (22mm) testine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları	48
Tablo 19: CIMplus testinin duyarlılık ve özgüllük sonuçları.....	49
Tablo 20: Karbapenemaz türü tespitinde kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması	50

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Beta laktam antibiyotiklerde ana grupların yapıları*	16
Şekil 2: Kombine Disk Metodu (MR: Meropenem, MR+ED: Meropenem+EDTA, MR+CL: Meropenem+Klavulanik asit, MR+BO: Meropenem+Boronik asit, TMO: Temosilin)	33
Şekil 3: mCIMplus sonuçlarının yorumlanması (12)	36
Şekil 4: Modifiye karbapenem inaktivasyon yöntemlerinin çalışılması ve değerlendirilmesi (Tsai et al. çalışmasındaki tablodan yararlanılarak hazırlanmıştır (10))	37
Şekil 5: mCIM, aCIM, eCIM ve CIMplus testleri yorumu	38



GİRİŞ VE AMAÇ

Enterobacteriaceae ailesi, toplum kaynaklı basit enfeksiyonlardan tıbbi bakımla ilişkili komplike, tedavisi zor enfeksiyonlara kadar geniş bir klinik tablo oluşturmaktadır. Özellikle tıbbi bakımla ilişkili enfeksiyonlarda artan antimikrobiyal ilaç direnci, morbidite ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır. Karbapenemler, genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) gibi direnç mekanizmasına sahip *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olmaları sebebiyle birçok enfeksiyonda son seçenek olarak tercih edilmektedir. Fakat son yıllarda önemi gittikçe artan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KDE) sebebiyle tedavi seçenekleri kısıtlanmakta ve mortalite oranları artmaktadır (1, 2). Bu direnç paternine sahip bakteriler plazmid aracılığı ile insandan insana hızla bulaşabilmektedir (3). Bu sebeple hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi oldukça önemlidir.

Giderek artan sıklığı nedeniyle karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, sürveyans ağları oluşturularak takip edilmektedir. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi (ECDC)'nin 2018 yılında yayınladığı raporda Türkiye'nin, KDE için endemik bölge olduğu ve 2010-2015 yılları arasındaki KDE sıklığının giderek arttığı vurgulanmaktadır (4). Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne bağlı Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans (CAESAR) ağının 2019 ve 2020 yıllarında yayınladığı raporlar incelendiğinde de Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* sıklığının yıllara göre artmakta olduğu görülmektedir (5, 6). ECDC'nin 2022 yılında yayınladığı raporda karbapenem dirençli *K. pneumoniae* oranının 2016 yılından günümüze giderek arttığı, 2020 yılındaki oranının ise %48,2 olduğu belirtilmiştir (7).

Karbapenem direncinin büyük çoğunluğundan beta laktamaz benzeri çeşitli karbapenemaz enzimi üretimi sorumludur. Bu enzimler içerisinde, sınıf A karbapenemazlar (KPC tipleri), sınıf B'de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL)'lar (VIM, NDM ve IMP) ve sınıf D oksasilinazlar (OXA-48 benzeri) bulunmaktadır. Bu dirençlerin tespit edilmesinde altın

standart olarak kullanılan moleküler yöntemlerin özgüllük ve duyarlılığı yüksektir (8). Ancak pahalı bir yöntem olması ve deneyimli personel gerektirmesi sebebiyle kullanımını istenen ölçüde yaygınlaşmamıştır.

Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullanılan daha uygun ve deneyimli personel gerektirmeyen fenotipik testler de vardır; Modifiye Hodge Testi, kombine disk metodu, karbapenem inaktivasyon yöntemi gibi. Bu testlerde yalnızca karbapenemaz varlığı tespit edilebilmekte, karbapenemaz türü tayin edilememektedir. Son yıllarda karbapenem inaktivasyon metoduna bazı modifikasyonlar yapılarak karbapenemaz varlığını tespit etmenin yanı sıra karbapenemaz türü de tespit edilebilmektedir (9-14).

Çalışmamızda karbapenemaz dirençli *Enterobacteriaceae* ailesini temsilen 100 *K. pneumoniae* izolatu için karbapenemaz tespitinde kullanılan çeşitli fenotipik yöntemler ile moleküler yöntem karşılaştırılıp etkinliklerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GENEL BİLGİLER

ENTEROBACTERIACEAE AİLESİ

Enterobacteriaceae ailesi taksonomisi hızla değişen, çok sayıda cins ve türe sahip, Gram negatif basillerin en geniş ve heterojen topluluğudur. Karmaşık yapısına rağmen az sayıda tür klinikte etken olarak karşımıza çıkmaktadır. Sınıflandırması biyokimyasal özellikleri, antijenik yapıları, DNA-DNA hibridizasyonu ve 16S rRNA dizilerine göre yapılmaktadır (15).

Enterobacteriaceae üyeleri toprakta, sularda, bitkilerde, insan ve hayvanların normal bağırsak florasında bulunabilirler. Hemen her tip enfeksiyon hastalığında etken olabilen ve laboratuvara gönderilen her tür numuneden izole edilebilen mikroorganizmalardır. Özellikle immunsuprese hastalar, hastane enfeksiyonlarına karşı oldukça duyarlıdır. Mukoz membran bütünlüğünü bozan invazif işlemler sonrasında kolonize olan suşlarla enfekte olabilirler. *Enterobacteriaceae* tarafından oluşturulan enfeksiyonlar, antibiyotikler, kemoterapi ve immunsupresan tedavilerin yaygınlaşmasından önce nispeten iyi seyreden hastalıklar olmuşlardır. Ancak gelişen tedavi seçenekleri ile birlikte bakteriler de direnç profillerini geliştirmektedirler (16).

Enterobacteriaceae suşlarının çoklu antibiyotik direnci geliştirmesi konusunda uyanık olunmalıdır. Bu ailenin neredeyse tamamı beta laktam antibiyotiklere karşı dirençlidir. Bu direnç kazanılmış veya kromozomal beta laktamazlara bağlıdır. Bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri kromozomal, indüklenbilir AmpC betalaktamazlara sahiptirler. Bu organizmalar; *Morganella morganii*, *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Providencia spp.*, *Aeromonas spp.*, *Citrobacter freundii* kompleksi ve *Enterobacter spp.*'dir. Duyarlı klinik

izolatlarda R plazmidi veya R faktör olarak bilinen plazmidlerin aktarılmasıyla antibiyotik direnci ortaya çıkabilir. R plazmidi; penisilinler, birinci, ikinci, üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonamı hidrolize etme özelliğine sahip genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerini kodlayan genleri taşır. Bu enzimleri taşıyan izolatların tespiti hem hasta tedavisine katkı sağlar, hem de hastane enfeksiyonlarının sürveyansı için büyük önem taşır (15).

Morfolojik Yapısı

Enterobacteriaceae üyeleri, 0.5-2 x 2-4 µm boyutlarında kısa, kalın Gram-negatif basillerdir. Enteobakteriyel ortak antijen isminde bir ortak antijenleri vardır. Peritriş flajella yapıları sayesinde hareketli olabilirler, bazı üyeleri ise hareketsizdir. Spor oluşturmazlar. Tüm üyeler fakültatif anaeroptur. Çeşitli seçici (Eosine Methylen Blue (EMB) agar, MacConkey agar) ve seçici olmayan (kanlı agar) besiyerlerinde üreyebilirler. Üreme esnasında basit besin öğelerine ihtiyaç duyarlar; glukozu fermente eder, nitratı indirger, katalaz pozitif ve oksidaz negatif özellik gösterirler (15).

Kültür Özellikleri

Bakterilerin besiyerlerinde görünüşleri tanımlama konusunda yol gösterici olabilmektedir. Örneğin koyun kanlı agarda büyük, kurşuni renkte, mukoid koloni, kapsülü bulunan *K. pneumoniae* suşlarını işaret edebilirken, ince bir film veya dalga gibi yayılan (swarming fenomeni) koloniler *Proteus* türlerini akla getirmektedir. Mac Conkey agar gibi laktoz içerikli besiyerleri sayesinde laktozu fermente etme özelliklerine bakılabilir. Laktozu fermente eden *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Serratia* türleri Mac Conkey agarda pembe-mor koloni oluştururken, laktozu yavaş fermente eden veya etmeyen *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Yersinia* türleri renksiz koloni oluşturur. Salmonella Shigella Agar (SS Agar), Hekton Enterik Agar (HEA), Ksiloz Lizin Deoksikolat Agar (XLD) gibi bazı seçici besiyerlerinin içeriğindeki safra tuzlarına karşı oluşan direnç ile *Salmonella*, *Shigella* gibi enterik patojenler, safra tuzları ile inhibe olan flora bakterilerinden ayrılmaktadır (16).

Biyokimyasal Özellikleri

Karbonhidrat kullanımı: Bakteriler anaerobik şartlarda karbonhidratları asit ve gazla dönüştürerek fermente etme durumlarına göre sınıflandırılırlar. Karbonhidratları metabolize eden pek çok bakteri fakültatif anaeroptur. Birkaç istisna dışında *Enterobacteriaceae* üyeleri genelde glukozu fermente ederler. Laktoz kullanım durumu ise değişkenlik göstermektedir. Karbonhidratları fermente etme durumlarını göstermek için iki şekerli (glukoz, laktoz) Kligler Demirli Agar/Kliger's Iron Agar (KIA agar) veya üç şekerli (glukoz, laktoz, sükröz) demirli/Triple Sugar Iron (TSI) agar kullanılır. Glukoz ve laktozu kullanan (glukoz pozitif, laktoz pozitif) *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri reaksiyon sonunda asit oluşturarak besiyerinin tümünü sarı renge çevirirler. Glukozu kullanan (glukoz pozitif), laktozu kullanmayan (laktoz negatif) bakterilerde ise dipte asidik (sarı), yüzeyde alkali reaksiyon (kırmızı) gözlemlenir. *Shigella* türleri buna örnek gösterilebilir. Bu besiyerlerinin içeriğindeki demir metabolize edildiğinde hidrojen sülfür (H₂S) açığa çıkarak besiyerinde siyah renk oluşturabilmektedir. *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus* türleri glukoz pozitif, laktoz negatif ve H₂S pozitif reaksiyon vermektedir. *Yersinia enterocolitica* ise sükrözü kullanır (sükröz pozitif) fakat laktozu kullanamaz (laktoz negatif). Bu sebeple TSI agarda asit-asit reaksiyon oluştururken, KIA agarda sükröz bulunmadığı için alkali-asit reaksiyon oluşturmaktadır (16).

Metil kırmızısı testi: Glukoz fermentasyonu sonucu oluşan pirüvik asidin kuvvetli asidik ortam oluşturmasını ölçen bir yöntemdir (16).

Voges-Proskauer testi: Asetil metil karbinolün (asetoin), atmosferik oksijen ve potasyum hidroksidin etkisiyle diasetile dönüşümüne dayanmaktadır. Bu yolu kullanan *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* grubu bakteriler çok az miktarda karışık asit ürettiklerinden pH'yı çok az düzeyde düşürürler. Bu sebeple metil kırmızısı besiyerinde değişiklik olmaz. Dolayısıyla istisnalar dışında VP pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğunun metil kırmızısı testi negatiftir (16).

Gaz oluşumu: Karbonhidratların fermentasyonu sonucu oluşan asit parçalanırken hidrojen ve karbondioksitten oluşan gaz açığa çıkar. Gaz oluşumu en iyi sıvı bir karbonhidrat besiyeri içine ters olarak yerleştirilmiş küçük Durham tüpünde saptanabilse de TSI agar ve KIA agarda da tespit edilebilmektedir. Bu gaz bakteride bulunan enzim türlerine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Çok miktarda oluşan gaz, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* türlerini akla getirmektedir (16).

ONPG (*o*-Nitrofenil- β -D-galaktopiranosid) testi: ONPG'de laktozdan farklı olarak glukoz yerine *o*-Nitrofenil gelmiştir. Bu farklılık laktoz fermentasyonu için gerekli olan laktozun hücre içine girmesini sağlayan β -Galaktozid permeaz enzim gerekliliğini devre dışı bırakarak β -Galaktosidaz enziminin saptanmasını kolaylaştırarak laktozu geç fermente eden bakterilerin tespitini sağlamaktadır. Aksi takdirde bazı *E.coli* suşlarının *Shigella* türlerinden (*Shigella sonnei*'nin bazı suşları hariç) ayrımı zor olabilmektedir. Bu test ayrıca, *Citrobacter* türlerinin bazı suşlarının ve *Salmonella* ser. *Arizonae*'nin (ONPG pozitif) çoğu *Salmonella* türünden (ONPG negatif) ayrımında çok faydalıdır (16).

Sitokrom oksidaz aktivitesi: *Enterobacteriaceae* üyeleri oksidaz negatiftir. Test 10-20 saniye içerisinde değerlendirilmelidir. Çünkü bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri geç yanlış pozitif verebilmektedir. Testin tel özeyle yapılması da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir (16).

Nitrat redüksiyonu: Bazı *Serratia* ve *Yersinia* türleri ile *Pantoea agglomerans*'ın bazı biyotipleri hariç tüm *Enterobacteriaceae* üyeleri nitratı nitrite indirirler. %0.1 konsantrasyonunda potasyum nitrat (KNO_3) içeren herhangi bir besiyerinde test uygulanabilir (16).

Sitrat kullanımı: Bakterinin metabolizma ve üremesi için sodyum sitratı kullanmasını tespit eder. Eğer sodyum sitrattan karbon kullanıldıysa, besiyerinde bulunan amonyum fosfattan nitrojen ayrışarak amonyak açığa çıkar. Bromtimol mavisi ile bu reaksiyon sonucu besiyerinde mavi renk oluşur (16).

İndol üretimi: Bakteride bulunan triptofanaz enzim varlığını tespit eden bir yöntemdir. Bakteri triptofan içeren besiyerine ekildiğinde, bu enzim ile triptofan, indol, pirüvik asit ve amonyağa dönüşmektedir. Pozitif olduğu durumda besiyerine damlatılan Kovaks ayracı ile kırmızı renk oluşmaktadır (16).

Üreaz üretimi: Üre içeren besiyerine ekilen bakterilerin üreyi kullanarak amonyak oluşturur. Bu da besiyerini pembe-kırmızı renge dönüştürür. Stuart'ın üre sıvı besiyeri aslında *Proteus* türleri için ayırt ettiricidir. Daha az üreaz salgılayan *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Brucella* ve *Bordatella bronchiseptica* gibi belli türler için Christensen üre agarı daha faydalıdır (16).

Lizin, ornitin ve arjinin dekarboksilasyonu: Çoğu bakteri türü, özgül aminoasitleri dekarboksile edebilen enzimlere sahiptir. Dekarboksilaz enzimi, aminoasitten CO₂ molekülünü uzaklaştırarak alkali reaksiyon veren aminler oluşturur. Bu pH değişimini ölçen çeşitli besiyerleri geliştirilmiştir. Sıklıkla tercih edilen besiyeri Falkow lizin sıvı besiyeridir. Ancak bu besiyeri *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia* grubu bakterilerin lizin dekarboksilaz aktivitesini saptamada kullanılamaz. Bu besiyerindeki modifikasyonlar ile hareket-indol-ornitin yarı katı agar besiyeri geliştirilmiştir.

Lizin demirli agar besiyeri, hidrojen sülfür ve lizin dekarboksilaz enzimi pozitif olan *Salmonella* türlerinin tanımlanmasında yardımcıdır (siyah dip, mor yüzey reaksiyonu). *Proteus* ve *Providencia* türlerinde yatık yüzeyde kırmızı renk oluşmaktadır.

Lizin dekarboksilaz testi, laktoz negatif *Citrobacter* türlerini (%100 negatif), *Salmonella* türlerinden (%98 pozitif) ayırmada kullanışlıdır. Ornitin dekarboksilaz testi, *Klebsiella* türlerini *Enterobacter* türlerinden ayırmada kullanışlıdır (16).

Fenilalanin deaminaz üretimi: Bu enzimin tespiti, *Proteus*, *Morganella* ve *Providencia* türlerinin diğer Gram negatif basillerden ilk ayırımında kullanılır. Sadece bu cinslerin üyeleri bu enzime sahiptir (16).

Hareket: Bakteri flajella ile hareket eder. Bu saptama için flajel boyaları mevcuttur. Hareket durumu, sıvı besiyerinden bir damla lam-lamel arası 40x büyütme ile incelenerek tespit edilebildiği gibi yarı katı agar besiyerleri ile de incelenebilir. Besiyerinde ekim çizgisinden etrafa yayılan difüz üreme zonunun makroskopik incelenmesi ile değerlendirilir. *Enterobacteriaceae* ailesinden *Shigella* ve *Klebsiella* türleri hareketsizdir. Çoğu hareketli *Enterobacteriaceae* üyesi 35°C'de saptanabilirken, *Yersinia enterocolitica* ve *Listeria monocytogenes* oda sıcaklığında hareketlidir (16).

Antijenik Yapısı

Isıya dayanıklı lipopolisakkarit: En önemli hücre duvarı antijenidir. En dışta somatik O polisakkaridi, ortada tüm *Enterobacteriaceae*'larda ortak olarak bulunan kor polisakkaridi (enterobakteriyel ortak antijen) ve merkezde lipid-A olmak üzere üç bileşenden oluşur. Kor polisakkaridi, bir bakterinin *Enterobacteriaceae* üyesi olarak sınıflandırılmasını sağlar. O polisakkaridi türlerin epidemiyolojik sınıflandırılmasında önemlidir. Lipid-A bileşeni endotoksin aktivitesinden sorumludur (15).

Kapsül: Kapsülde bulunan K antijeni tipe özgül polisakkaritlerdir. Isıya duyarlıdır. K antijenleri, O antijeninin tespitinde zorluk oluşturmaktadır. Bu problem, mikroorganizmanın kaynatılmasıyla ortadan kaldırılır. Kaynatıldıktan sonra ısıya duyarlı olan K antijenleri ortadan kalkarak ısıya dayanıklı O antijenleri kalır (15).

Flajella: Flajellada bulunan H antijenleri ısıya duyarlı proteinlerdir. Hareketli suşlar flajella (peritriş) ile çevrilidir. *Enterobacteriaceae* üyelerinin çoğu hareketlidir, yalnızca *Klebsiella*, *Shigella* ve *Yersinia* hareketsizdir (15).

Fimbria: Kromozom aracılı genel fimbria ve konjugatif plazmidlerle kodlanan seks pilisi olmak üzere iki gruba ayrılır. Genel fimbria, bakterinin konak hücre yüzeyinde özgül reseptörlere bağlanması için önemlidir. Seks veya konjugasyon pilisi ile genetik materyalin aktarımını sağlar (15).

Taksonomi

Gelişen teknolojiyle birlikte mikroorganizmaların sınıflandırması değişkenlikler göstermiş, tür ve cins sayısında hızlı bir artış olmuştur. *Enterobacteriaceae* ailesinde; Edwards ve Ewing'in 1972 yılında yaptığı tanımlamada 11 cins ve 26 tür, Farmer ve arkadaşlarının 1985 yılında yaptığı tanımlamada 22 tür, 69 cins ve 29 tür enterik grup bulunmakta iken günümüzde 37 cins, 148 tür, biyogrupları ve isimlendirilmemiş enterik grupları mevcuttur (16).

Soy kavramı, aynı aile içindeki benzer biyokimyasal reaksiyona sahip cinslerin bir araya getirilmesiyle oluşturulmuştur. *Enterobacteriaceae* ailesinin güncel taksonomisi Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1: *Enterobacteriaceae* ailesinin taksonomisi (Koneman 7. Baskısından kısaltılarak hazırlanmıştır) (16)

Soy Adı	Yeni Adı	Eski Adı
Soy I: <i>Esherichieae</i>	<i>Escherichia coli</i>	
	<i>Escherichia coli</i> , inaktif	Alkalescens-Dispar
	<i>Escherichia alberti</i>	Yeni tür
	<i>Escherichia fergusonii</i>	Enterik grup 10
	<i>Escherichia hermannii</i>	Enterik grup 11
	<i>Escherichia vulneris</i>	Enterik grup 1 API grup 2 Alma grup 1
	<i>Shigella</i>	
Soy II:	<i>Edwardsiella tarda</i>	<i>Edwardsiella</i> <i>anguillimortifera</i> Asakusa Grup

<i>Edwardsiella</i>	<i>Edwardsiella tarda</i> biyogrup 1	
	<i>Edwardsiella hoshinae</i>	
	<i>Edwardsiella ictaluri</i>	
Soy III: <i>Salmonelleae</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S.cholera-suis</i>
		<i>S.typhi</i>
		<i>S.enteritidis</i>
Soy IV: <i>Citrobactereae</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i>	<i>Levinea amalonaticus</i>
	<i>Citrobacter braakii</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 6
	<i>Citrobacter farmeri</i>	<i>Citrobacter amalonaticus</i> biyogrup 1
	<i>Citrobacter freundii</i>	
	<i>Citrobacter gillenii</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 10
	<i>Citrobacter koseri</i>	<i>Levinea molanatica</i> <i>Citrobacter diversus</i>
	<i>Citrobacter murlinae</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 11
	<i>Citrobacter rodentium</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 9
	<i>Citrobacter sedlakii</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 8
	<i>Citrobacter werkmanii</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 7
	<i>Citrobacter youngae</i>	<i>Citrobacter</i> genomtür 5
Soy V: <i>Klebsielleae</i>	<i>Klebsiella granulomatis</i>	<i>Calmmatobacterium granulomatis</i>
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>
	<i>Klebsiella alba</i>	Yeni tür
	<i>Klebsiella singaporensis</i>	Yeni tür
	<i>Klebsiella variicola</i>	Yeni tür
	<i>Raoultella planticola</i>	<i>Klebsiella</i> tür 2 <i>Klebsiella trevisanii</i> <i>Klebsiella planticola</i>
	<i>Raoultella terrigena</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>
	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Sarı pigmentli <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter sakazakii</i>
	“ <i>Enterobacter agglomerans</i> kompleksi”	<i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia milletiae</i>
	<i>Enterobacter asburiae</i>	Enterik Grup 17 Atipik <i>Citrobacter</i>
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	
	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	<i>Erwinia cancerogena</i> <i>Enterobacter taylorae</i> Enterik Grup 19
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>
	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i>	<i>Enterobacter dissolvens</i> <i>Erwinia dissolvens</i>
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	Enterik Grup 75
<i>Enterobacter kobei</i>	Enterik Grup 69 Japon NIH Grubu 21	

<i>Kosakonia cowanii</i>	Japon NIH Grubu 42 <i>Enterobacter cowanii</i>
<i>Lelliottia nimipressuralis</i>	<i>Erwinia nimipressuralis</i> <i>Enterobacter nimipressuralis</i>
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	Atipik <i>Enterobacter</i> <i>aerogenes</i> <i>Enterobacter gergoviae</i>
<i>Pluralibacter pyrinus</i>	<i>Erwinia pirina</i> <i>Enterobacter pyrinus</i>
<i>Hafnia alvei</i>	<i>Enterobacter hafniae</i>
<i>Hafnia alvei</i> biyogrup 1	“ <i>Hafnia protea</i> ” <i>Obesumbacterium proteus</i> biyogrup 1
<i>Pantoea agglomerans</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> HG XIII <i>Erwinia herbicola</i> <i>Erwinia milletiae</i>
<i>Pantoea ananatis</i>	<i>Pantoea ananas</i> <i>Enterobacter agglomerans</i> HG VI <i>Erwinia ananas</i> <i>Erwinia uredovora</i>
<i>Pantoea citrea</i>	Yeni tür
<i>Pantoea dispersa</i>	<i>Enterobacter agglomerans</i> HG III
<i>Pantoea punctata</i>	Yeni tür
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>indologenes</i>	<i>Erwinia stewartii</i>
<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	<i>Erwinia stewartii</i>
<i>Pantoea terrea</i>	Yeni tür
<i>Serratia entomophila</i>	
<i>Serratia ficaria</i>	
“ <i>Serratia</i> ” <i>fonticola</i>	
<i>Serratia grimesii</i>	
“ <i>Serratia liquefaciens</i> <i>grubu</i> ”	<i>Enterobacter liquefaciens</i> , <i>S.</i> <i>Liquefaciens</i> türü içinde değişik biyogruplar
<i>Serratia marcescens</i>	
<i>Serratia odorifera</i> biyogrup 1	
<i>Serratia odorifera</i> biyogrup 2	
<i>Serratia plymuthica</i>	<i>Bacterium plymuthica</i>
<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>proteamaculans</i>	Bknz. <i>Serratia liquefaciens</i> <i>grubu</i>
<i>Serratia quinivorans</i>	<i>Serratia proteamaculans</i> subsp. <i>quinovora</i>
<i>Serratia rubidaea</i>	

Soy VI: Proteeae	<i>Proteus hauseri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biyogrup 3, DNA grup 3
	<i>Proteus mirabilis</i>	
	<i>Proteus myxofaciens</i>	
	<i>Proteus penneri</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biyogrup 1
	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Proteus vulgaris</i> biyogrup 2
	<i>Proteus vulgaris</i> biyogrup 3	
	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>morganii</i>	<i>Proteus morganii</i>
	<i>Morganella morganii</i> subsp. <i>sibonii</i>	<i>Morganella morganii</i> biyogrup 1
	<i>Morganella morganii</i> subsp. 3	
	<i>Providencia alcalifaciens</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biyogrup 1,2
	<i>Providencia heimbachae</i>	
	<i>Providencia rettgeri</i>	
	<i>Providencia rustigianii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biyogrup 3 <i>Providencia friedericiana</i>
	<i>Providencia stuartii</i>	<i>Providencia alcalifaciens</i> biyogrup 4
Soy VII: <i>Yersinieae</i>	<i>Yersinia aldovae</i>	<i>Y.enterocolitica</i> -benzeri Grup X2
	<i>Yersinia bercovieri</i>	<i>Y.enterocolitica</i> biyogrup 3B
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	
	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Y.enterocolitica</i> biyogrubu
	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Y.enterocolitica</i> biyogrubu
	<i>Yersinia kristensenii</i>	<i>Y.enterocolitica</i> biyogrubu
	<i>Yersinia mollaretii</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> biyogrup 3A
	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Pasteurella pestis</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> subsp. <i>pestis</i>
	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	
	<i>Yersinia rohdei</i>	
	“ <i>Yersinia</i> ” <i>ruckeri</i>	“Kırmızı ağız bakterisi”

Patogenez ve İmmunité

Enterobacteriaceae ailesinde bazıları tüm cinslerde ortak bazıları belirli suşlara özgün çok çeşitli virülen faktör mevcuttur.

Endotoksin: Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin lipid-A bileşeni bu aktiviteden sorumludur. Gram negatif enfeksiyonların kompleman ve sitokin salınımı gibi birçok sistemik bulgusu endotoksin tarafından aktive edilmektedir (15). Bu etkiler deneysel olarak gözlemlenmiştir. Deney hayvanlarına küçük miktarlarda intravenöz endotoksin enjeksiyonu, ateş, lökopeni, damar içi kanama, hipotansiyon ve dolaşım sal yıkıma yol açmıştır (16).

Ekzotoksin: Bakterilerce ortama salınan, özgül nitelikte, toksik özellikleri bulunan protein yapıda salgılardır. Enterotoksin, Shigatoksin, Shigatoksin benzer toksinler, hemolizinler ve sideroforlar örnek olarak verilebilir (15).

Kapsül: Kapsül yapısındaki hidrofilik antijenlerin fagositik hücrelerin hidrobik yüzeylerini itmesiyle fagositozdan korunur. Bu antijenler zayıf immunojendir, komplemanı iyi aktive etmezler (15).

Adhezinler: Hücre yüzey reseptörlerine bağlanmayı, hücre içine girmeyi, fagositozdan kaçmayı sağlayan fimbria, pilus gibi yapılardır (15).

Antijenik faz varyasyonu: Somatik O, kapsüller K ve flajellar H antijenleri farklı şekillerde eksprese edilebilir veya hiç edilmeyebilir (faz varyasyonu). Bu durum antikor aracılı hücre öldürme sisteminden kaçışı sağlar (15).

Tip III sekresyon sistemleri: Bakterinin virülans faktörlerinin hedef ökaryotik hücreye aktarımını sağlar. *Yersinia*, *Salmonella*, *Shigella*, enteropatojenik *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Chlamydia* gibi çeşitli bakterilerde mevcuttur. Yokluğu durumunda bakterinin virülansı azalır (15).

Çoğalma faktörlerinin temini: Bakteriler in vivo ortamda metabolizmaları için gerekli olan besinleri elde edebilmek için yarışmak zorundadırlar. Demir bakteriler için önemli bir çoğalma faktörüdür. Ancak hem proteinlerine ya da demir bağlayan proteinlere bağlı olarak bulunur. Bakteriler demir elde edebilmek için siderofor veya enterobaktin, aerobaktin gibi demir bağlayan bileşikler üretirler (15).

Laboratuvar Tanısı

Kültür: *Enterobacteriaceae* üyeleri genelde seçici olmayan besiyerlerinde (%5 koyun kanlı agar vb.) kolaylıkla üretilirler. Steril kabul edilen beyin omurilik sıvısı, plevra, periton, perikard gibi numuneler yalnızca %5 koyun kanlı agara ekilebilir. Balgam, gaita gibi flora ile kontamine numunelerin ekimi için seçici, ayırt edici besiyerlerine ihtiyaç vardır. Bu sebeple floralı numuneler için Mac Conkey agar, EMB agar besiyerleri faydalı olacaktır. Bu besiyerleri aynı zamanda laktoz kullanımı hakkında fikir vererek tanımlama konusunda yol gösterir. Dışkı örneklerinde *Salmonella*, *Shigella* türlerinin normal floradan ayırıştırılarak izolasyonu için Hektoen Enterik Agar, XLD Agar, Salmonella Shigella agar gibi seçiciliği yüksek besiyerlerine ihtiyaç duyulabilir (15).

Genel olarak bu ailenin üyeleri normal atmosferik ortama sahip $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ 'lik etüvde, 18-24 saat inkübasyon ile ürer. *Yersinia enterocolitica* istisnai olarak 4°C 'de 2 hafta veya daha uzun süre inkübasyon ile üretilmektedir (15).

Biyokimyasal tanımlama: Bu ailenin üyelerini tanımlayabilmek için yapılabilecek pek çok biyokimyasal test vardır. Bunların bir kısmından daha önce "Biyokimyasal Reaksiyonlar" başlığında bahsedilmişti. Bu testler ayrı ayrı manuel olarak uygulanabildiği gibi, bir araya getirilerek tanımlama yapılabildiği ticari kitler de mevcuttur. Bunun yanı sıra matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI TOF MS) yöntemi kullanılarak da kısa sürede doğru ve güvenilir tanımlama yapabilmek mümkündür (15).

Serolojik sınıflandırma: Bir izolatın klinik olarak öneminin belirlenmesinde veya epidemiyolojik olarak sınıflandırılmasını sağlasa da bu ailenin üyeleri arasındaki çapraz reaksiyonlar nedeniyle kullanımı sınırlıdır (15).

Moleküler tanımlama: Tür tanımlanması konusunda türe özgül genleri (16S rRNA vb.) saptayarak günümüzde en doğru ve güvenilir sonuçları veren yöntemlerdir (15).

Klinik Hastalıklar

Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri insanda intestinal floranın önemli bir kısmını oluşturur, bu sistem haricinde genellikle patojen olarak bulunmaktadır. Bu ailenin üyelerine bağlı enfeksiyonları, barsak ve barsak dışı enfeksiyonlar olarak ikiye ayırabiliriz.

Escherichia, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* türleri yaygın gastroenterit etkenleri olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunların haricinde nadiren *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Edwardsiella*, *Proteus*, *Morganella* türlerine ait gastroenterit tabloları da görülebilmektedir (15).

Shigella türleri dışındaki *Enterobacteriaceae* üyeleri menenjit, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, apse, yara enfeksiyonu, bakteriyemi, sepsis gibi pek çok organ ve sistemi etkileyen barsak dışı enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Bazı türlere bağlı spesifik enfeksiyonlar da görülebilmektedir. Örneğin *Salmonella typhi* türüne bağlı enterik ateş, *Yersinia pestis* türüne bağlı veba gibi. *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella*, *Citrobacter* türleri immun sistemi baskılanmış kişilerde hastane kökenli enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Bu cinslere ait bakteriler sıklıkla çoklu ilaç direncine sahip oldukları için tedavileri güç olabilmektedir (15).

Tedavi

Enterobacteriaceae türlerine bağlı enfeksiyonların tedavisinde beta laktam ve beta laktamaz inhibitör kombinasyonları, aminoglikozidler, kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklin, rifampisin ve trimetoprim-sülfametoksazol kullanılmaktadır. Yapılan in vitro duyarlılık test sonuçları ve klinik deneyimler tedavi seçimi konusunda yol göstermektedir. *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatları genelde pek çok antibiyotiğe duyarlıyken, diğer türlerde sıklıkla intrensek veya edinilmiş mekanizmalarına bağlı direnç görülmektedir. *Serratia*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Enterobacter* türlerinde kromozomal olarak kodlanan intrensek direnci görülebilmektedir. Bunun yanında çeşitli risk faktörlerine bağlı olarak gelişen edinilmiş direnç profilleri de bu aile üyelerinin tedavisinde güçlük oluşturabilmektedir. Uygunsuz antibiyotik kullanımı, profilaksi verilmeksizin mukozal bütünlüğü bozan travmatik işlemlerin uygulanması ve üriner katater kullanımı bu risk faktörlerindedir. İlaveten, hastane ortamında duyarlı mikroorganizmaların, antibiyotiklerin terapötik düzeylerinin altındaki konsantrasyonlara maruz kalması, hızla direnç gelişimine yol açabilmektedir (15). Daha önceden karbapenemlerin kullanımı tedavide önemli bir silah iken, son yıllarda karbapenemaz üreten bakterilerin sıklığının artması, tedaviyi güçleştirmiştir. Bu sebeple bu ailenin üyelerinin enfeksiyonlarının tedavisinde in vitro duyarlılık testleri ile birlikte direnç profillerinin belirlenmesi önem arz etmektedir.

ANTİBAKTERİYEL İLAÇLAR

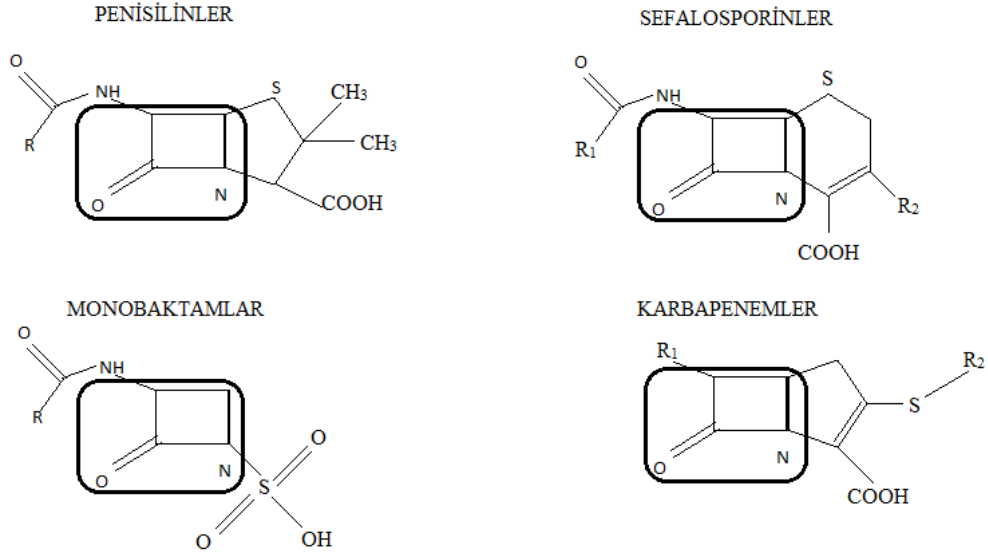
1928 yılına kadar antiseptikler, mikroorganizmalara karşı lokal olarak kullanılsa da sistemik enfeksiyonlara karşı etkili olamamışlardır. Bu yılda, prontosil boyasının metabolizasyonu sonucu para aminobenzen sülfonamide dönüşerek farelerde streptokok enfeksiyonlarına karşı etkili olduğu keşfedilmiştir. İlerleyen yıllarda *Penicillium* küfünün, staflokokların çoğalmasını önlediği fark edilmiştir(16). Böylelikle tıpta yeni bir dönem başlamıştır.

Antibiyotikler temel olarak dört farklı mekanizmayla bakteriler üzerine etki eder;

1. Hücre duvar sentez inhibisyonu (Beta laktamlar, glikopeptitler, lipopeptitler, polipeptitler, izoniyazid, etiyonamid, etambutol, sikloserin)
2. Protein sentez inhibisyonu (Aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler, oksazolidinonlar, kloramfenikol, makrolidler, ketolidler, klindamisin, streptograminler)
3. Nükleik asit sentez inhibisyonu (Kinolonlar, rifampin ve rifabutin, metronidazol)
4. Antimetabolitler (16).

Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Bu grupta yer alan penisilinler, sefalosporinler, sefamisinler, karbapenemler, monobaktamlar, beta laktamaz inhibitörlerinin tümü ortak bir beta laktam halkası taşıdığı için bu isimle anılmaktadırlar (Şekil 1). Bakterilerin çoğunun hücre duvar yapısında peptidoglikan tabaka bulunmaktadır. Bu tabakada, N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit moleküllerinden oluşan zincirler ve bu zincirleri çapraz bağlayarak kuvvetlendiren peptit bağları bulunmaktadır. Zincir ve çapraz bağların yapımı transpeptidaz, transglikozilaz, karboksipeptidaz gibi özel enzimler tarafından olmaktadır. Bu enzimler penisilin bağlayan protein (PBP)'ler olarak da bilinirler ve bu proteinler beta laktam antibiyotiklerin hedef bağlanma bölgesidir. Antibiyotikler PBP'lere bağlanır ve peptidoglikan tabakanın oluşmasını önleyerek bakteri ölümünü sağlar. Bu sebeple bu gruptaki antibiyotikler bakterisidal etkilidir (16).



Şekil 1: Beta laktam antibiyotiklerde ana grupların yapıları*

*Beta laktam halkası kalın çizgi ile gösterilmiştir (16).

Bakteri-antibiyotik arasındaki savaş elbette burada son bulmamaktadır. Bakteriler de beta laktam antibiyotiklere karşı üç temel mekanizmayla karşılık vererek direnç geliştirirler;

1. Antibiyotik ve hedef PBP arasındaki etkileşimin önlenmesi,
2. Antibiyotiğin PBP'ye bağlanmasında modifikasyon,
3. Antibiyotiği parçalayan beta laktamaz enzim üretimi (hidroliz) (16).

İlk direnç mekanizması genellikle Gram negatif bakterilerde (özellikle *Pseudomonas*) görülür. Gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan tabakanın üzerinde bulunan dış membran yapısındaki porin değişikliği, por açıklığı boyutunu ve elektrik yükünü değiştirebilir, böylece antibiyotik porlardan geçemeyerek hücre dışında kalır (16).

İkinci direnç mekanizması; PBP'nin aşırı üretimi (nadiren), yeni PBP kazanımı (*Staphylococcus aureus*'ta metisilin direnci) ve PBP'nin rekombinasyon (*Streptococcus pneumoniae*'de penisilin direnci) veya nokta mutasyonu (*Enterococcus faecium*'da penisilin direnci) sonucu modifiye olması ile olabilir (16).

Son mekanizmada ise bakteriler, dört atomlu beta laktam halka yapısındaki amid bağı parçalayarak etkisiz hale getirir (17). Tüm bu direnç mekanizmalarından bir sonraki bölümde detaylıca bahsedilecektir.

Penisilinler: Temel yapısında *Penicillium chrysogenum* küfünün kültüründen elde edilen beta laktam halkasına sahip organik asit bulunmaktadır. Düşük toksisiteli, oldukça etkili antibiyotiklerdir. Çeşitli modifikasyonlarla mide asidine daha dirençli, sindirim sisteminden daha fazla emilen, penisilinazlar tarafından parçalanmaya dirençli, Gram negatif bakterilere karşı daha etkili versiyonlar üretilmiştir (15). Mevcut penisilin sınıfları ve etki spektrumları Tablo 2’de gösterilmiştir.

Tablo 2: Penisilinler ve etki spektrumları (15)

Sınıf	Antibiyotikler	Etki Spektrumu
Doğal Penisilinler	Penisilin G (benzilpenisilin) Penisilin V (fenoksimetil penisilin)	β -hemolitik streptokokların tamamı ve diğer birçok türe, meningokoklara ve Gram pozitif anaeroplara çoğuna etkilidir. Stafilokoklara etkisi sınırlıdır. Gram negatif bakterilere etkisi zayıftır.
Penisilinaza Dirençli Penisilinler	Metisilin, Nafsilin, Oksasilin, Kloksasilin, Dikloksasilin	Doğal penisilinlere benzer, farklı olarak stafilokoklara karşı yüksek etki gösterir.
Geniş Spektrumlu Penisilinler	Aminopenisilinler (Ampisilin, Amoksisilin) Karboksipenisilinler (Karbonisilin, Tikarsilin) Üreidopenisilinler (Piperasilin)	Gram pozitif bakteri etkinliği doğal penisilinler ile aynı, farklı olarak bazı Gram negatif basillere karşı etkilidir.
Beta Laktamaz İnhibitörlü Beta Laktamlar	Ampisilin sulbaktam Amoksisilin klavulanat Tikarsilin klavulanat Piperasilin tazobaktam	Doğal penisilinlere benzer, farklı olarak beta laktamaz üreten stafilokoklar ve bazı Gram negatif basillere karşı artmış etki gösterir.

Sefalosporinler ve Sefamisinler: *Cephalosporium* küfünden izole edilen beta laktam antibiyotiklerdir. Sefamisinler, sefalosporinlerden farklı olarak içerdikleri dihidrotiazin halkasında sülfür yerine oksijen içerirler. Bu sebeple beta laktamaz hidrolizine daha dirençlidir. Hemen hemen penisilinlerle aynı etki mekanizmasına sahip olmakla birlikte, daha geniş antibakteriyel etki spektrumları vardır, birçok beta laktamaza dayanıklıdır ve gelişmiş farmakokinetik özelliklere sahiptirler (15). Sefalosporinlerin sınıflandırılması Tablo 3’te gösterilmiştir.

Tablo 3: Sefalosporinler, Sefamisinler ve etki spektrumlarına bazı örnekler (15)

Sınıf	Antibiyotikler	Etki Spektrumu
Dar spektrumlu sefalosporinler (1. Kuşak)	Sefaleksim, Sefalotin, Sefazolin, Sefapirin, Sefradin	Gram pozitif bakterilere etki oksasilin ile aynı. Bazı Gram negatiflere (<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>P.mirabilis</i>) etkili.
Genişlemiş/Expanded spektrumlu sefalosporinler (2. Kuşak)	Sefaklor, Sefuroksim	Gram pozitif bakterilere etki oksasilin ile aynı. Gram negatiflere ek olarak <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Proteus</i> türlerine de etkili.
Geniş/Broad Spektrumlu sefalosporinler (3. Kuşak)	Sefiksim, Sefotaksim, Seftriakson, Seftazidim	Gram pozitif bakterilere etki oksasilin ile aynı. Gram negatiflere ek olarak <i>Pseudomonas</i> türlerine de etkili.
Genişletilmiş/Extended Spektrumlu Sefalosporinler (4. Kuşak)	Sefepim, Sefpirom	Gram pozitif bakterilere etki oksasilin ile aynı. Gram negatiflere karşı biraz daha artmış etkinlik.
5. Kuşak	Seftabiprol, Seftarolin	MRSA enfeksiyonlarına etkili.
Genişlemiş/Expanded spektrumlu sefamisinler	Sefotetan, Sefoksitin	Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere benzer etki, fakat beta laktamazlara karşı daha dirençli

Karbapenemler ve Monobaktamlar: Karbapenemler önemli, tedavide sıkça tercih edilen, pek çok bakteri grubuna etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Monobaktamlar ise dar spektrumlulardır, sadece aerop Gram negatif bakterilere karşı etkilidirler. Dar spektrumlu olması sebebiyle hasta florasını olumsuz etkilemeden, sadece hedef mikroorganizmaya etki eder. Fakat bu avantajına rağmen tedavide pek tercih edilmezler. Son yıllarda karbapenemaz üretimi sonucu gelişen karbapenem direnci sorun oluşturmaya başlamıştır. Bu direnç profillerinden bir sonraki bölümde detaylıca bahsedilecektir (15). Mevcut karbapenem ve monobaktam listesi Tablo 4’te gösterilmiştir.

Tablo 4: Karbapenemler ve Monobaktam (15)

Sınıf	Antibiyotikler	Etki Spektrumu
Karbapenemler	Ertapenem, İmipenem, Meropenem, Doripenem	Birçok aerobik ve anerobik Gram pozitif ve Gram negatif bakteriye karşı etkilidir. Ancak oksasiline dirençli stafilokoklar, çoğu <i>Enterococcus faecium</i> ve bazı Gram negatif basillere (bazı <i>Burkholderia</i> , <i>Stenotrophomonas</i> ve bazı <i>Pseudomonas</i> suşları) karşı etkisizdir.
Monobaktam	Aztreonam	Bazı aerobik Gram negatif basillere etkili, fakat anaeroplara ve Gram pozitif bakterilere karşı etkisizdir.

ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI

Bakterilere bağlı enfeksiyonlar, antibiyotiklerin keşfi ile bakterilerin üreme hızları yavaşlatılarak (bakteriyostatik) veya üremeleri durdurularak (bakterisid) kontrol altına alınacağı düşünülse de ne yazık ki bakteriler son derece dayanıklı mikroorganizmalardır. Antibiyotiklere maruz kalmaları durumunda hızla uyum göstererek direnç geliştirirler. Antibiyotik direnci temel olarak üç mekanizma ile gelişmektedir;

1. Hücre geçirgenliğinde azalma ve/veya dışa atım pompaları ile hedefe erişimin engellenmesi

2. Antibiyotiğin bakteri tarafından üretilen bir enzim ile parçalanması veya değiştirilmesi ile inaktivasyonu
3. Antibiyotiğin bağlandığı hedef reseptör yapısında değişiklik olması (16)

Direnci kodlayan genler kromozom üzerinde veya plazmid, transpozon gibi kromozom dışı bir yapıda bulunabilir. Kromozomal genler genellikle yapısal olup nispeten stabildirler. Plazmid ve transpozon üzerindeki genler ise konjugasyon yoluyla bakteri türleri hatta cinsleri arasında yatay gen aktarımını sağlar. Yatay gen aktarımı, bakteriyofaj ile transdüksiyon ve doğrudan DNA aktarımı ile transformasyon yoluyla da olabilmektedir (16).

Kromozomal direnç için mutasyon gelişimi veya sessiz bir genin aktivasyonu gereklidir. Direnç gelişimi daha sıklıkla, bakteriler arasında gen aktarımıyla olmaktadır. Direnç genleri en sık konjugasyon yoluyla aktarılmaktadır. Bu mekanizma, *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* ve anaerob türler arasında oldukça yaygındır (16).

Antibiyotik direnç genleri sürekli olarak eksprese edilebilir veya antibiyotik maruziyeti sonrasında indüklenerek eksprese olabilir. Gram negatiflerin ürettiği pek çok β -laktamaz yapısal olarak üretilir, ancak enzim üretimi β -laktam antibiyotiğe maruziyet sonrası daha da artabilir (16).

Beta Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Hedefe erişimin engellenmesi: β -laktam ve glikopeptit yapıdaki antibiyotiklerin reseptörleri olan penisilin bağlayıcı protein (PBP)'ler gram pozitif bakterilerin hücre duvarlarında kolayca erişilebilir oldukları ve plazma zarını geçmeleri gerekmediği için gram pozitif bakterilerin beta laktam antibiyotiklere direnci genellikle bu yolla olmamaktadır. Gram negatif bakterilerde ise hücre duvarının üzerinde bulunan dış membran yapısındaki değişiklikler yoluyla bu antibiyotiklere karşı direnç oluşabilmektedir. Bakteriler hücre membranı üzerinde bulunan dışa atım pompaları veya gram negatif bakterilerin dış membranındaki porinler vasıtasıyla antibiyotiklerin hedefe erişimlerini engelleyebilirler (16).

Dışa Atım Pompaları: Dışa atım (efflux) pompaları bakterilerin çözünen maddeleri hücre dışına atmak için kullandığı doğal bir savunma mekanizmasıdır. Toksik olan maddeleri bu yolla hücre dışına attığı gibi bazı duyarlı bakteri suşlarında bazı antibiyotik grupları tarafından bu pompalar aktiflenerek antibiyotiklerin de hücre dışına atımını sağlayabilirler. Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde bu mekanizma pek kullanılmaz. Daha sıklıkla florokinolon grubu antibiyotik direncinde bu mekanizma önemlidir. Özgül dışa

atım pompaları sadece bir substratı hücre dışına atarken diğer gruptaki pompalar bir çok substratı hücre dışına atabilir. İkinci sınıftaki antibiyotikler çoklu ilaç direnci (ÇİD) ile ilişkilidir. Beş grup dışı atım pompası ailesi vardır. Bu ailelerin her biri ÇİD ile ilişkili genetik bilgiyi kodlar. Bunlar; çoklu ilaç ve toksik bileşik ihracı (MATE), majör kolaylaştırıcı süper aile (MFS), stafilokokal çoklu direnç (SMR), direnç nodülü oluşturma bölümü (RND), ATP bağlayan kaset (ABC) (16).

Porin: Gram negatif bakterilerde hücre içine doğru moleküllerin akışı dış membranda bulunan hidrofilik yapıdaki porinler aracılığıyla olmaktadır. β -laktamlar gibi küçük, hidrofilik yapıdaki antibiyotikler hücre içine girebilmek için porinleri kullanırlar. Chow ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada β -laktam antibiyotikler içinde porinlerden geçiş konusunda en iyi performans gösteren antibiyotik, çift kutuplu, hidrofilik yapıya sahip imipenem olarak belirlenmiştir (18). Porin gen ekspresyonunda veya dış membran yapısındaki mutasyonlar sonucu hücre içine geçirgenlik azaltılarak antibiyotik direnci oluşabilmektedir.

Parçalama veya değiştirme ile antibiyotik inaktivasyonu:

β -laktamazlar: Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı geliştirilen en yaygın direnç mekanizması beta laktamaz enzim üretimidir. Bu enzimler, bu gruptaki ortak yapı olan beta laktam halkasını parçalayarak ilacı etkisiz hale getirirler. Bilinen en eski beta laktamazlardan biri, stafilokoklarda penisiline karşı direnci sağlayan penisilinazdır (19). Moleküler yöntemlerin gelişmesiyle günümüzde, beta laktamazların sayısı 890'ı aşmıştır, muhtemelen bu artış giderek devam edecektir (17, 20, 21). Bu karmaşık ve çok sayıdaki beta laktamaz enzimleri farklı şekillerde sınıflandırılmışlardır. Yaygın olarak kullanılan Ambler sınıflandırması, enzimlerin moleküler yapısına göre oluşturulmuştur. Bush ve Jacoby ise enzimleri substratlarına, enzim inhibitörleri gibi işlevsel özelliklerine göre sınıflandırmışlardır (22). Beta laktamaz enzimlerini inhibe etmek için klinikte üç çeşit β -laktamaz inhibitörü kullanılmaktadır. Bunlar; klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamdır. Bu bileşikler beta laktamaz enzimlerine geri dönüşümlü veya geri dönüşümsüz olarak bağlanarak beta laktam antibiyotiklerle birlikte verildiğinde beta laktam antibiyotiklere enzimlerin yıkıcı etkinliğine karşı korur. Bu inhibitörlerin tek başlarına sınırlı antibakteriyel etkinlikleri vardır (16).

Hedef değişikliği:

Penisilin Bağlayan Proteinler: Beta laktam grubu antibiyotiklerin reseptörü olan penisilin bağlayıcı proteinlerin yapısının değişmesi, gram pozitif bakterilerde görülen önemli bir direnç mekanizmasıdır. Metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının *mecA* geni ekspresyonu sonucu beta laktam antibiyotiklere direnç geliştirmesi, *S. pneumoniae* izolatlarında direnç genlerinin izolatlar arasında yatay aktarımı sonucu PBP'lere afinitenin azalmasıyla direnç kazanması bu mekanizmaya örnek olarak verilebilir. Bununla birlikte Yamachika et al. *E. coli*'nin karbapenem direncinden PBP2 mutasyonunun sorumlu olduğunu göstermişlerdir (23).

DNA Giraz: Florokinolon grubu ilaçlara karşı direnç genelde DNA sentezinde görevli olan bu enzimdeki kromozom mutasyonlarından kaynaklanmaktadır (16).

KARBAPENEM DİRENÇ MEKANİZMALARI

Karbapenem direnci enzimatik ve nonenzimatik yol olmak üzere başlıca iki mekanizmayla gerçekleşmektedir. Daha az sıklıkla karşılaştığımız nonenzimatik mekanizmalar;

- Antibiyotiklerin hücre içine girişini sağlayan porin gen mutasyonu sonucu hücre içine girişin engellenmesi
- Moleküllerin hücre dışına atımını sağlayan effluks pompalarını kodlayan genlerin aşırı ekspresyonu sonucu antibiyotiklerin hücre dışına atımının artırılması
- Bunlara eşlik eden genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ve AmpC üretimidir (24).

Karbapenem direncinin büyük orandaki sebebi, karbapenemaz üretimi sonucu enzim hidrolizidir. Karbapenemazlar moleküler yapılarına göre Ambler A, B ve D sınıflarına, fonksiyonel yapılarına göre Bush-Jacoby 2d, 2f ve 3 sınıflarına ayrılır (22) (Tablo 5).

Tablo 5: Karbapenemazların sınıflandırması (25-28)

Ambler Sınıflandırması	A	B	D
Bush-Jacoby Sınıflandırması (2010)	2f	3	2d
Enzim Aktif Bölge	Serin	Çinko	Serin
İnhibitör	Boronik asit, Klavulanik asit ile zayıf inhibisyon	Dipiklonik asit, EDTA	NaCl (25)
Plazmid Kaynaklı	KPC, GES, IMI-2	NDM, VIM, IMP-1, IMP-2 (25)	OXA-48 (26)
Kromozom Kaynaklı	IMI-1, SME, NmcA, SFC-1	BC-2, L1, CphA, BlaB/GOB-1, IND-1, FEZ-1, TUS-1, MUS-1 (27)	OXA-48, OXA-23, OXA-181
Beta Laktamlar Üzerine Etkinliği	Tüm beta laktamlara etkili (GES hariç)	Azteronam hariç tüm beta laktamlara etkili	Karbapenemlere zayıf, Penisilinlere kuvvetli etki

Sınıf A Karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemazlar, beta laktam antibiyotikler üzerinde geniş hidrolitik aktiviteye sahiptir. Aktif bölgelerinde serin bulunmaktadır. Beta laktamaz inhibitörlerinden klavulanik asit ve tazobaktam ile kısmi inhibe olur. Yeni beta laktamaz inhibitörlerinden avibaktam ve vaborbaktam bu sınıftaki karbapenemazları ve D sınıfında bulunan OXA-48 enzimini inhibe eder (28). Bu sınıfta yer alan KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemase), GES (Guiana extended spectrum), IMI-2 (Imipenem hydrolyzing β -lactamase) plazmid aracılığı ile aktarılırken, IMI-1 (Imipenem hydrolyzing β -lactamase), SME (*Serratia marcescens* enzyme), NmcA (non-metallokarbapenemase-A), SFC-1 (*Serratia fonticola* karbapenemase) kromozomal kaynaklıdır (26).

KPC'ler bu grupta klinik olarak en sık karşılaşılan enzimlerdir. KPC, ilk kez 1996'da Amerika'da bir *K. pneumoniae* izolatında gösterilmiştir (29). İlerleyen zamanlarda, Amerika'nın diğer bölgelerine, Porto Riko, Kolombiya, Yunanistan ve Çin'e yayılmıştır. Günümüzde pek çok Avrupa ve Güney Amerika ülkesinde KPC izolatlarına bağlı salgınlar bildirilmektedir (30, 31). KPC enzimi, *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık *K. pneumoniae* izolatlarında görülmüştür (30). KPC enzimi üreten izolatlar genellikle çoklu ilaç dirençlidir, tedavi seçenekleri sınırlıdır ve ölüm oranları %50'nin üzerindedir (1, 2, 30, 32).

Sınıf B Karbapenemazlar

Sınıf B karbapenemazların serin beta laktamazlardan farklı olarak aktif bölgesinde çinko bulunmaktadır. Bu sebeple enzim, metal şelatörü olan etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ile inhibe olmaktadır. Geniş beta laktamaz etkinliği vardır, ancak aztreonamlar üzerine etkili değildir. Bu sebeple bu enzim üreten izolatların tedavilerinde aztreonam bir seçenek olabilir. Bu sınıfta yer alan *Bacillus cereus* (BC II), *Bacillus anthracis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (L1), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB/GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1) izolatlarında direnç genleri kromozomal olarak kodlanmıştır. VIM (Verona integron encoded metallo beta lactamase), IMP (imipenemase metallo beta lactamase) ve NDM (New Delhi metallo beta lactamase) ise plazmid ile aktarılmaktadır (27).

İlk edinilmiş IMP-1, 1991'de Japonya'da *Serratia marcescens* izolatında tespit edilmiştir (33). Daha sonra dünya geneline yayılmıştır (27, 34). VIM ve IMP, Yunanistan, Tayvan ve Japonya'da endemiktir (27, 34), dünyanın pek çok bölgesinde sporadik vakalar da bildirilmiştir (34). NDM-1 enzimi ilk kez 2008 yılında İsveç'te Hindistan'a seyahat öyküsü bulunan bir kişiden izole edilen *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir (35). İlerleyen tarihlerde dünyanın pek çok bölgesinde bu enzime sahip izolatlar (genellikle *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında) görülmüştür (36). İzolatların çoğu Hindistan bağlantılı bulunmuştur. Daha sonraki yapılan çalışmalar Hindistan'dan sonra Balkan ve Ortadoğu ülkelerinin NDM-1 için ikinci kaynak olabileceğini göstermiştir (37). *bla_{NDM-1}* genini taşıyan plazmidler çok çeşitlidir ve diğer karbapenemaz genleri (OXA-48, VIM), plazmid aracılı sefalosporinaz genleri, GSBL genleri, aminoglikozid direnç genleri (16S RNA metilaz), makrolid direnç genleri (esteraz), rifampin (rifampin modifiye edici enzim) ve sulfametoksazol direnç genleri gibi pek çok direnç genini aynı anda barındırarak çoklu ilaç direnci paternine neden olabilir. Pek çok NDM-1 üreticisi yalnızca tigesiklin ve kolistine duyarlıdır (36, 37). Fakat günümüzde ne yazık ki kolistin direncini kodlayan *mcr-1* geni ve NDM-1 ve OXA-48 genlerinin bir arada bulunduğu izolatlar da görülmeye başlanmıştır (38, 39).

Sınıf D Karbapenemazlar

Oksasilin ve kloksasilini kuvvetli bir şekilde hidrolize edebilme yetenekleri sayesinde oksasilinazlar olarak bilinen sınıf D karbapenemazların OXA-163 türü dışında karbapenemazlar üzerindeki hidrolitik aktivitesi zayıftır. Aktif bölgelerinde serin bulunan bu karbapenemaz grubunda, 200'den fazla enzim türü bulunmaktadır (24). Bu enzim grubu EDTA ile inhibe olmayıp klavulanik asit veya tazobaktam ile inhibisyonu değişkendir (22), NaCl ile

in vitro inhibe olur (24). İlk OXA enzimi, 1985 yılında Edinburg, İskoçya'dan izole edilen çoklu ilaç direnci bulunan bir *Acinetobacter baumannii* suşunda 1993 yılında Paton ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (40). Bu gruba ait enzimler çoğunlukla *Acinetobacter* türlerinde bulunsalar da ilk olarak 2001 yılında İstanbul'dan izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda karbapenemlere dirençli OXA-48 enzimi tanımlanmıştır (41). Bu enzim ilerleyen zamanlarda *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii*, *P. mirabilis* türlerinde de gösterilmiştir. OXA-48 enziminin nokta mutasyonu ile oluşan OXA-181 enzimi de benzer aktiviteye sahiptir. Direnç geninin plazmid ile hastalar arası hızlı aktarımı sebebiyle Türkiye'den (42), Güney Avrupa ve Afrika ülkelerinden (26) hastane kaynaklı salgınlar bildirilmiştir. Ayrıca ülkemiz bu enzim grubu için endemik bölge olarak bildirilmiştir (25).

KARBAPENEM DİRENCİNİN VE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ TESPİTİ

Enterobacteriaceae türlerinde karbapenem direncinin ve mümkünse profilinin doğru ve hızlı tanımlanabilmesi hastaya etkin tedavi uygulanarak morbidite ve mortalitesinin azaltılması ve uygun izolasyon önlemlerine uyularak hastalar arası yayılımın önüne geçilmesi açısından oldukça önemlidir. Karbapenem direnci pek çok mekanizmayla oluşabilir. Bunlardan en sık tespit edilen mekanizma, karbapenemaz üretimidir (43). Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) 2021 rehberi, meropenem zon çapının <28 mm, minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerinin >0.125 mg/L olduğu durumlarda karbapenemaz açısından tarama yapılmasını önermektedir (44). Bunu tespit etmek için çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemler bulunmaktadır. Çalışılan bölgenin mevcut direnç profili ve testin duyarlılık, özgüllüğüne göre test seçimi yapılabilir.

Karbapenemazların Fenotipik Yöntemlerle Tespiti

Modifiye Hodge testi: Bu test; her laboratuvar için ulaşılabilir ve maliyet gerektirmeyen bir test olmasına rağmen yoruma açık ve zaman bağımlı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ayrıca testin duyarlılığı karbapenemaz türleri arasında değişkenlik göstermektedir. CLSI 2014'te önerilen bu test, günümüze kadar çeşitli modifikasyonlara uğrayarak CLSI 2018 güncellemesinde kullanımdan kaldırılmıştır (45).

Kombine disk yöntemi: Karbapenem ve karbapenemaz inhibitörlerinin sinerjisine bakılan bu yöntemde karbapenemaz varlığı ve karbapenemaz türü tespit edilebilir. Bu yöntem ulaşılabilir, nispeten fazla maliyet gerektirmeyen ve genotip hakkında fikir veren, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (46, 47).

Karbapenem inaktivasyon yöntemi ve türevleri

CIM: Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM), karbapenemaz varlığını tespit eden basit, ucuz ve kısa sürede sonuç verebilen bir yöntemdir (48). Bu yöntemde bazı değişiklikler yapılarak CLSI 2017'de modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (mCIM) olarak önerilmiştir (49).

mCIM: Bu yöntemde CIM'den farklı olarak, bakteri süspansiyonu su yerine Triptik Soy Buyyon (TSB) ile hazırlanmakta, süspansiyona meropenem diski konduktan sonraki inkübasyon süresi 2 saatten 4 saate çıkarılmakta ve MHA ekildikten sonra değerlendirme öncesi inkübasyon 6 saatten 18-20 saate çıkarılmaktadır (49). Yapılan çalışmalarda bu yöntem, CIM'e göre daha duyarlı (%93' %82) iken, aynı özgüllüğe sahip (%100) bulunmuştur. Aynı zamanda OXA-48 benzeri karbapenemazları tespit etmek konusunda da daha duyarlı olduğu gösterilmiştir (50). Karbapenemaz varlığının yanında karbapenemaz türü hakkında bilgi edinebilmek için CLSI 2018'e EDTA ilaveli karbapenem inaktivasyon metodu (eCIM) ilave edilmiştir (45).

eCIM: Test edilecek her suş için TSB agar ile birlikte EDTA ilaveli TSB agarda bakteri süspansiyonu hazırlanır. İçerisine 10 µg meropenem diski ilave edilip 35±2°C'de 4 saat ± 15 dk inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası süspansiyon içerisindeki meropenem diskleri, karbapenem duyarlı standart suşun (*E. coli* ATCC® 25922) yayıldığı MHA besiyerlerine konur. Besiyeri 35±2°C'lik etüvde 18-24 saat inkübasyon sonrası değerlendirilir. İki diskin zon çapları arasındaki fark ≥5 mm ise Sınıf B karbapenemaz enziminin bulunduğu düşünülür (45). Bu

yöntemden yola çıkarak fenilboronik asit ve amonyum bikarbonat ilavesiyle karbapenemaz tespitinin değerlendirildiği çalışmalar da yapılmıştır (11, 12).

Kültür bazlı yöntemler: Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'lar plazmidleri aracılığıyla özellikle riskli hastalar arasında (yoğun bakım hastaları, yaşlı hastalar, immunsuprese hastalar) hızla yayılarak hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır. Bu nedenle hastanelerde rektal taramalarla bu izolatların hızlı tespiti, izolasyonu oldukça önemlidir (51, 52). Bu amaçla Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) bir yöntem önermiştir (53). Bu yöntemde test edilecek olan rektal sürüntü numunesi ile birlikte 10 µg karbapenem diski, 5 ml'lik TSB agara konup bir gece inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası MacConkey agara pasajlanır. Değerlendirme sırasında laktoz pozitif koloniler belirlenip karbapenemaz tespiti açısından işleme alınır.

Taramalar için geliştirilmiş kromojenik besiyerleri de mevcuttur. Bu besiyerleri gram pozitif ve karbapenem duyarlı gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden içeriğe sahiptir. Rektal sürüntü numunesinin bu besiyerlerine ekimi sonrası belirtilen renklere üreyen koloniler karbapenemaz varlığı açısından ileri tanımlama işlemine alınır. CHROM agar KPC (CHROM agar, Fransa), kromid OXA-48, chrom ID Carba, Colorex KPC (Biomed Diagnostics, ABD), Hardy CHROM (Hardy Diagnostics, ABD), Ramba Chrom-KPC (Gibson Bioscience, ABD) ve Brilliance CRE (Thermo Diagnostics, ABD) besiyerleri bu amaçla üretilen ticari besiyerleridir. Papadimitriou-Olivgeris ve ark.'nın yaptıkları çalışmada chromID Carba besiyerinin duyarlılığını %96.5, özgüllüğünü %91.2 olarak bulmuşlardır (54). Ticari besiyerleri OXA-48 benzeri karbapenemazları tespit etmek konusunda yetersiz bulunduğu için Nordmann ve arkadaşları tarafından SUPERCARBA besiyeri geliştirilmiştir (55). Girlich ve ark.'nın yaptıkları çalışmada ise SUPERCARBA besiyeri ile iki ticari kit (CHROM agar KPC ve Brilliance CRE) karşılaştırılmıştır. SUPERCARBA besiyerinin duyarlılığı %96.5 iken Brilliance CRE ve CHROM agar KPC besiyerlerinin duyarlılıkları sırasıyla %76.3 ve %43 olarak tespit edilmiştir. Özgüllükleri ise benzer bulunup, %57 ile %68 arasında değişmiştir (56).

Biyokimyasal yöntemler: Karbapenemaz varlığını kısa sürede (<2 saat), düşük maliyetle tespit eden bu yöntemde, karbapenem hidrolizi sonucu oluşan pH değişikliği indikatör aracılığıyla renk değişimine sebep olur. Bu amaçla geliştirilen ticari kitlerden CarbaNP (Karbapenemase Nordmann-Poirel) testinde indikatör olarak fenol kırmızısı, Blue Carba Testi (BCT)'nde bromtimol mavisi kullanılır. Bu testler karbapenemaz üreten suşları, yeni oluşan herhangi bir enzim olsa dahi tespit edebilir (43) ve karbapenem direnci gösteren

diğer mekanizmalardan ayırt etmeyi sağlar. Nordmann ve ark. yaptıkları çalışmada (57) CarbaNP testinin duyarlılık ve özgüllüğünün %100 bulmalarına rağmen, Tijet ve ark. (58) ve Mitra ve ark. (59) yaptıkları çalışmalarda duyarlılığı daha düşük tespit etmişler ve bu durumun OXA-48 gibi karbapenem hidrolizi zayıf olan enzim grubundan kaynaklandığını düşünmüşlerdir.

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI TOF MS): Bu yöntemde test edilecek bakteri ile karbapenemler karıştırılır. Karbapenemaz varlığı durumunda, karbapenem hidrolizi sonucu kütle spektrumunda karbapenemlere özgül piklerin kaybolması veya yüksekliğindeki azalmanın tespit edilmesiyle tanımlanır (43). İlk olarak Hrabák ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntemin duyarlılığını 96.67% özgüllüğünü ise %97.87 olarak tespit etmişlerdir (60). Papagiannitsis ve ark. ise yaptıkları çalışmada testin duyarlılığını %76 olarak tespit etmişler ve bu duruma OXA-48 tipi karbapenemazların yol açtığını düşünmüşlerdir. Çalışmanın devamında amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) ilavesi sonrası duyarlılığın %98'e çıktığını ifade etmişlerdir (61). Testin kısa sürede sonuç vermesi, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması (62) gibi avantajlarının yanında, cihazın pahalı olması, MALDI-TOF ayarlarının tür tespit etmek için kullanılan farklı olması gibi dezavantajları bulunmaktadır (61).

İmmunokromatografik yöntemler: Bu yöntemde, kromatografik kağıda sabitlenmiş karbapenemaz enzimlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar ile test edilecek bakteride ilgili enzim bulunması durumunda ortaya çıkan immunkomplekslerin oluşturduğu renk değişimi ile tanımlanır. Pasteran ve ark. yaptıkları çalışmada OXA-48 enzimini immunokromatografik lateral flow testiyle 4 dakikada %100 duyarlılık ve özgüllükle tespit etmişlerdir (63). Glupczynski ve arkadaşları OXA-48 ve KPC tespit etmek için geliştirilmiş lateral akımlı iki ticari testi değerlendirmiş ve duyarlılık ve özgüllüğü %100 olarak tespit etmişlerdir (64). Bu yöntem spesifik belirlenmiş enzim tespit etmek konusunda oldukça başarılıdır. Bu sebeple belirli bir enzim türünün endemik olduğu bölgelerde kullanımı tercih edilebilir (43).

Karbapenemazların Genotipik Yöntemlerle Tespiti

Fenotipik yöntemler basit, ulaşılabilir ve maliyet etkin olmalarına rağmen, altın standart olan moleküler yöntemlerle doğrulanmaları gerekmektedir. Bu amaçla polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), oligonükleotid hibridizasyon yöntemi, klonal ilişkinin moleküler analizi ve sekans analizi gibi yöntemler kullanılabilir (43).

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR): Karbapenemazların moleküler yöntemlerle tespit edilmesi için sıklıkla tercih edilen yöntem PZR çeşitleridir. Enzimlerin primerleri kullanılarak tek veya çoklu gerçek zamanlı PZR ile sık görülen karbapenemaz türleri kısa sürede tespit edilebilmektedir. Duyarlılık ve özgüllükleri pek çok ticari kit karşılaştırılarak çalışmalar yapılmış ve duyarlılık ve özgüllükleri %100 olarak tespit edilmiştir (8, 65, 66). Fakat bu yöntemin primeri bulunmayan enzimleri tespit edememesi, pahalı olması, deneyimli personel gerektirmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle karbapenem direnci bulunan, moleküler testi negatif sonuçlanmış izolatlar, klonlama, sekanslama gibi ileri moleküler yöntemlerle analiz edilmelidir (43).

Oligonükleotid hibridizasyon yöntemi: Bu yöntemde aynı reaksiyonda çok sayıda gen araştırması yapılabilir. Çalışma için öncelikle test edilecek bakteri izolatının DNA izolasyonu yapılır. Daha sonra işaretli dUTP nükleotidleri eklenerek amplifikasyon sağlanır. Amplifikasyon sonucu oluşan oligonükleotidler hibridize olur. Son olarak hibridizasyon sonucu oluşan nükleotidlerin floresan ışınması tespit edilerek ölçüm yapılır (67). Bu amaçla kullanılan ticari kitlerin ortalama test süresi 4-7 saat, duyarlılık ve özgüllükleri %100'dür (68). Yetkin laboratuvar gereksinimi ve maliyetli olması sebebiyle bu yöntem daha çok referans ve araştırma laboratuvarları için uygundur (43).

Klonal ilişkinin moleküler analizi: Moleküler yöntemler bakteri izolatların direnç profillerinin tanımlanmasının yanında epidemiyolojik çalışmalar, salgınların kaynağının tespiti, riski izolatların analizi, klonal ilişkilerin analizi gibi amaçlarla kullanılır. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) ve multilokus sekans tiplleme (MLST) bu amaçla tercih edilebilen yöntemlerdir. PFGE yönteminde bakteriye ait genom restriksiyon enzimleriyle fragmentlere ayrılır. Bu fragmentler elektriksel alan oluşturularak yürütülür, oluşan görüntü belirli kriterler ışığında değerlendirilir (43). MLST'de korunan 7 gen bölgesinin belirli alanları kullanılarak, bakterilerin tanımlandığı bir yöntemdir. Her bir suş için 7 lokustaki alleller, allellik profili veya dizi analizi tanımlanır. Bu yöntemin kullanılabilmesi için öncelikle polimeraz zincir reaksiyonu ile ürün elde edip bunların lokus analizinin yapılması gereklidir (69).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

ÇALIŞMANIN ÖRNEKLEMİ

Çalışmamıza 2018-2021 tarihleri arasında Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen ve karbapenemaz tarama kriterlerine uyan 100 *K. pneumoniae* izolatu dahil edildi.

Karbapenemaz tarama kriteri olarak EUCAST 2021 rehberine uyuldu. Buna göre disk difüzyon yönteminde meropenem inhibisyon zon çapı <28 mm veya otomatize sistem ile antibiyotik duyarlılığı çalışılan izolatlar için minimum inhibisyon konsantrasyonu >0.125 mg/L olan suşlar karbapenemaz varlığı yönünden ileri değerlendirmeye alındı.

Aynı etkenle tekrarlayan üremesi olan hastaların izolatları yalnızca bir kez çalışmaya dahil edildi.

İzolatlar çalışma gününe kadar stok besiyerinde (Mast Cryobank®, Mast Group Ltd, İngiltere) -80°C'de muhafaza edildi.

KLİNİK ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, *ENTEROBACTERIACEAE* TÜRLERİNİN İZOLASYONU VE TANIMLANMASI

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden idrar numuneleri %5 koyun kanlı agar (RTA Lab, Türkiye) ve Eosin Methylen Blue (EMB) agar (RTA Lab, Türkiye) besiyerlerine, idrar dışı örnekler ise bu besiyerlerine ilaveten çikolata agar (RTA Lab, Türkiye) besiyerlerine ekilerek, 35°C'lik etüvde 24-48 saat inkübasyon sonrasında konvansiyonel yöntemler ile değerlendirmeye alındı. Değerlendirme neticesinde morfolojik olarak

Enterobacteriaceae olduğu düşünölen (EMB agarda laktoz pozitif, mukoid, S koloniler) koloniler ileri identifikasyon işlemlerine alındı.

Klinik numunelerin tanımlanmasında konvansiyonel ve otomatize yöntemler kullanıldı. Otomatize yöntem için VITEK 2 Compact 60 (bioMerieux, Fransa) cihazı kullanıldı. Her izolat için iki adet 12x75 mm'lik polisteren test tüpüne dispenser ile 3'er ml %0,45'lik steril serum fizyolojik konuldu. %5 koyun kanlı agardaki taze pasajlardan (18-24 saatlik) 0.5 MacFarland bulanıklığına eşit olacak miktarda koloni steril öze ile alınıp test tüplerinden ilkinde aktarıldı. İlk tüpler vortekslenerek homojen bir bakteri süspansiyonu elde edildi. İdentifikasyon için VITEK 2 GN ID kartı ile cihaza yüklendi.

İZOLATLARIN ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

İzolatların antimikrobiyal duyarlılıkları için disk difüzyon yöntemi ve otomatize sistem ile çalışıldı.

Disk difüzyon yöntemi için %5 koyun kanlı agardaki taze pasajlardan (18-24 saatlik) Mueller Hinton Broth (RTA Lab, Türkiye) solüsyonunda 0.5 MacFarland bulanıklığına eşit olacak miktarda koloni steril öze ile alınarak bakteri süspansiyonu hazırlandı. Steril pamuklu eküvyon çubuk ile bakteri süspansiyonu homojen bir şekilde Mueller Hinton Agar (RTA Lab, Türkiye) besiyerine yayıldı. EUCAST önerileri doğrultusunda belirlenen antibiyotik diskleri MHA besiyerine yerleştirildikten sonra 35°C'lik etüvde 18-24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirildi.

Otomatize sistem ile antibiyogram çalışabilmek için, identifikasyon amacıyla hazırlanan ilk tüplerden ikinci tüplere 145 µL bakteri süspansiyonu aktarılıp vortekslendi. Tüpün içerisine idrar örnekleri için VITEK 2 AST-327, idrar dışı örnekler için VITEK 2 AST-325 kartları konarak cihaza yüklendi. Barkod okuyucu yardımıyla numune bilgileri cihaza kaydedildi. Sonuçlar 18-24 saatlik inkübasyonun ardından cihaz üzerinden değerlendirildi.

Laboratuvarımızda tanımlama ve antibiyotik duyarlılık testleri için aylık olarak standart suşlarla internal kontrol yapılmaktadır. Ayrıca laboratuvarımızın dış kalite kontrol programı üyeliği bulunmaktadır.

FENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Kombine Disk Metodu

Karbapenemaz üreten bakterilerdeki KPC, MBL ve OXA-48 varlığının belirlenmesinde fenotipik testlerden kombine disk yönteminde KPC&MBL&OXA-48 disc kit (Liofilchem, İtalya) kullanıldı.

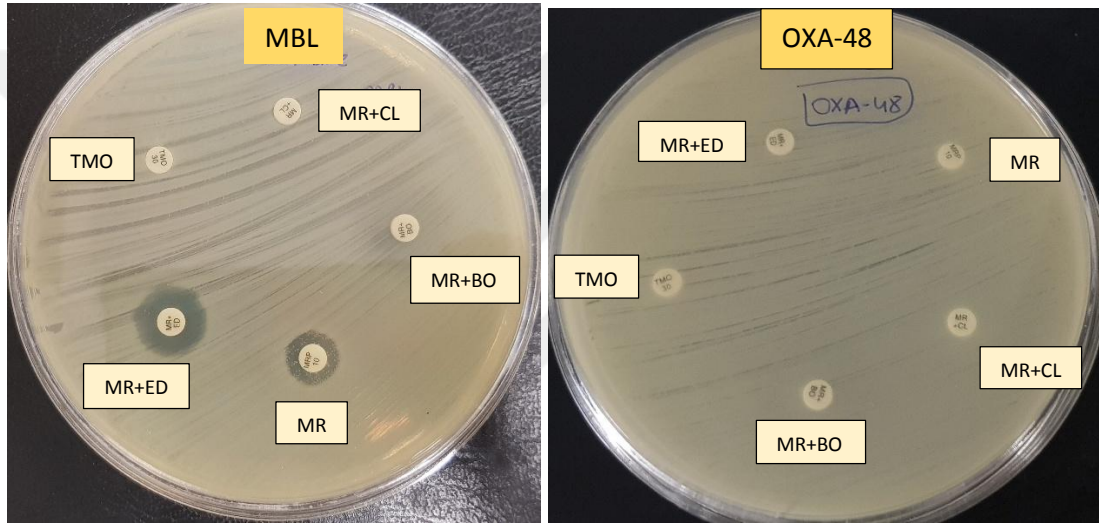
Bu setin içerisinde MR (meropenem 10 µg), MR+ED (meropenem+EDTA), MR+BO (meropenem+boronik asit), MR+CL (meropenem+kloksasilin) ve TMO (temosilin 30 µg) diskleri bulunmaktadır. Bu testte Sınıf A karbapenemazların tespiti için fenilboronik asit, Sınıf B karbapenemazların tespiti için EDTA inhibisyonundan faydalanılır. Temosilin direnci ise Sınıf D karbapenemaz varlığını göstermektedir.

Üretici firmanın önerileri doğrultusunda saf kültürden 0.5 MacFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanıp steril pamuklu eküvyon çubuğu ile MHA besiyerine yayıldı. Set içerisindeki diskler besiyerine yerleştirildikten sonra etüvde 35±1°C 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası değerlendirme, EUCAST yorumları ve üretici önerileri doğrultusunda inhibitör içeren disk zon çaplarındaki artışa bakılarak yapıldı (Tablo 6). EUCAST direnç tespiti kılavuzunda “Sinerji tanımlanması için kesin değerler, ticari ürünlerin kullanım kılavuzlarında bulunmaktadır” ifadesi yer almaktadır (70). Şekil 2’de çalışmamız neticesinde tespit edilen MBL ve OXA-48 izolatları görülmektedir.

Tablo 6: Kombine disk testi sonuçlarının yorumlanması

İnhibitör ile birlikte meropenem inhibisyon zon çapında artış			Temosilin (TMO)	β-Laktamazlar
Fenilboronik asit (MR+BO)	EDTA (MR+ED)	Kloksasilin (MR+CL)		
≥ 4 mm	<5 mm	<5 mm	-	KPC
<4 mm	≥ 5 mm	<5 mm	-	MBL
≥ 4 mm ve	<5 mm	≥ 5 mm	-	AmpC+porin kaybı veya efflux
<4 mm	<5 mm	<5 mm	<11 mm	OXA-48

Internal kontrol olarak AmpC ve azalmış porin ekspresyonu için *Enterobacter cloacae* CCUG 59627, Metallo- β -laktamaz (VIM) için *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440, Metallo- β -laktamaz (NDM-1) için *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13443, Metallo- β -laktamaz (IMP) için *E. coli* NCTC 13476, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) için *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13438, OXA-48 için *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13442, negatif kontrol amacıyla da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 suşları kullanıldı.



Şekil 2: Kombine Disk Metodu (MR: Meropenem, MR+ED: Meropenem+EDTA, MR+CL: Meropenem+Klavulanik asit, MR+BO: Meropenem+Boronik asit, TMO: Temosilin)

Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM) ve Türevleri

Test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 1 μ L öze miktarı koloni, 2 mL Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri içeren tüpe alındı. Hazırlanan bakteri süspansiyonu içerisine 10 μ g meropenem diski eklenerek 35°C'lik etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası bu meropenem diski, 0.5 MacFarland standardında hazırlanmış karbapenem duyarlı *E. coli* ATCC® 25922 bakteri süspansiyonu yayılmış olan MHA besiyerine yerleştirildikten sonra 35°C'lik etüvde 16-20 saat daha inkübe edildi. CLSI önerilerine (45) uyularak, meropenem diskinin çevresinde 6-15 mm inhibisyon zonu görüldüğünde veya 16-18 mm inhibisyon zonu

içerisinde tekli üreme tespit edildiğinde test edilen suş karbapenemaz pozitif olarak kabul edildi. ≥ 19 mm inhibisyon zonu görüldüğünde ise test edilen suş karbapenemaz negatif kabul edildi. mCIM testi neticesinde karbapenemaz pozitif kabul edilen suşlar karbapenemaz türü tespiti için ileri değerlendirmeye alındı. Rehberde aynı zamanda 16-18 mm inhibisyon zonu veya ≥ 19 mm zonu içerisinde tekli üremenin tespit edildiği sonuçların belirsiz olduğunu, karbapenemaz varlığını tespit etmek açısından ilave teste ihtiyaç olduğu belirtilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7: mCIM testi sonuçlarının yorumlanması (45)

MEM Zon Çapı	Karbapenemaz
6-15 mm	Pozitif
16-18 mm (Tekli üreme)	Pozitif
≥ 19 mm	Negatif
16-18 mm	Belirsiz
≥ 19 mm (Tekli üreme)	Belirsiz

Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (aCIM):

Test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 1 μ L öze miktarı koloni, 2 mL Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri içeren tüpe alındı. İlâveten pH'sı 7.0'a ayarlanmış amonyum bikarbonat (Sigma A6141) son konsantrasyon 50mM olacak şekilde ilave edildi. Hazırlanan süspansiyona 10 μ g meropenem diski eklenerek 35°C'lik etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası meropenem diski, 0.5 MacFarland standardında hazırlanmış karbapenem duyarlı *E. coli* ATCC® 25922 bakteri süspansiyonu yayılmış olan MHA besiyerine yerleştirildikten sonra 35°C'lik etüvde 16-20 saat daha inkübasyona devam edildi. Değerlendirme; CLSI M100 S28 ve Gelmez ve ark. çalışmasının değerlendirme kriterlerinin uyularak iki farklı şekilde yapıldı (11).

Tablo 8: aCIM sonuçlarının yorumlanması

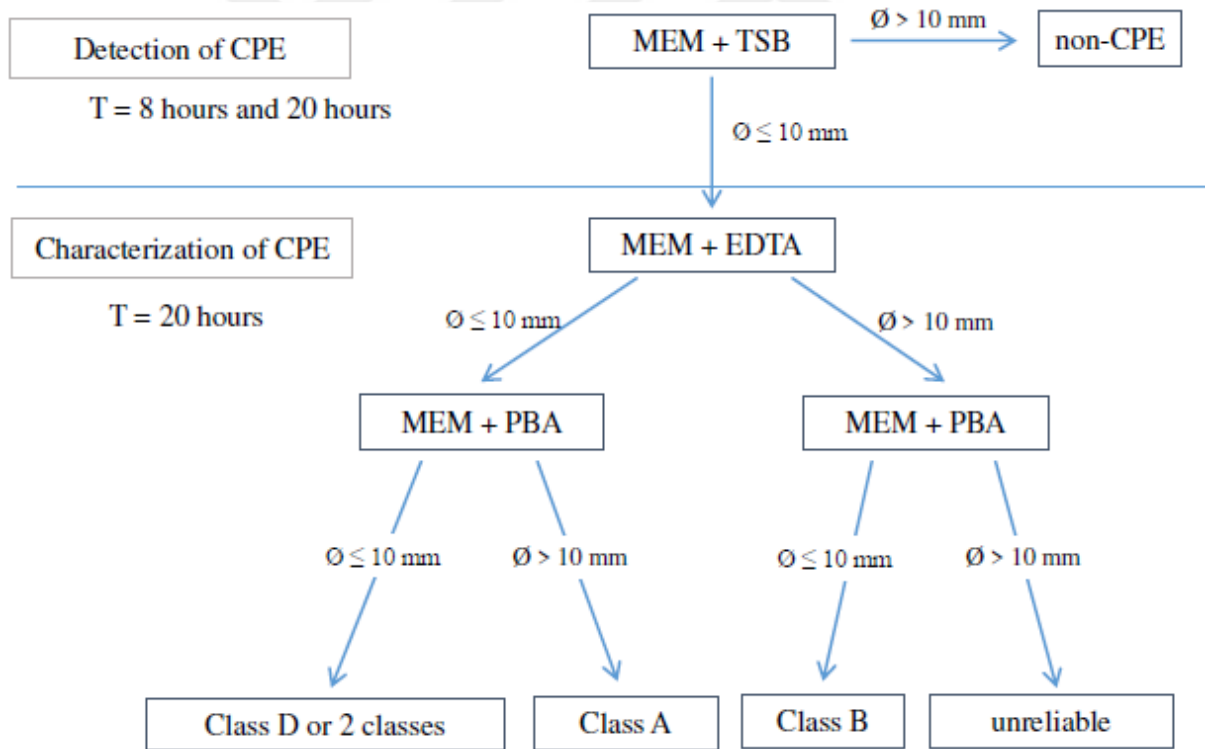
CLSI M100 S28 (45)		Gelmez ve ark. (11)	
MEM Zon Çapı	Sonuç	MEM Zon Çapı	Sonuç
<19 mm	Pozitif	<22 mm	Pozitif
≥ 19 mm	Negatif	≥ 22 mm	Negatif

EDTA ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (eCIM): Bu yöntem için birisinde 2 mL Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri içeren, diğesinde 2 mL TSB besiyerine ilaveten son konsantrasyonu 5 mM (20 µL 0.5 M EDTA) olacak şekilde EDTA ilave edilmiş iki tüp kullanıldı. Her iki tüpe de test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 1 µL öze miktarı koloni eklendi. Hazırlanan bakteri süspansiyonları içerisine 10 µg meropenem diski eklenerek 35°C'lik etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her iki meropenem diski, 0.5 MacFarland standardında hazırlanmış karbapenem duyarlı *E. coli* ATCC® 25922 bakteri süspansiyonu yayılmış olan MHA besiyerlerine yerleştirildikten sonra 35°C'lik etüvde 16-20 saat daha inkübasyona devam edildi. CLSI önerilerine (45) uyularak, mCIM testi neticesinde karbapenemaz pozitif kabul edilen suşlar karbapenemaz türü tespiti için eCIM testi değerlendirmesine alındı. Her iki meropenem diskinin etrafındaki inhibisyon zon çapları arasında ≥ 5 mm fark olduğunda karbapenemaz türü, Sınıf B karbapenemaz (metallobetalaktamaz) olarak kabul edildi. Zon çapları arasındaki fark ≤ 4 mm olduğunda ise non-metallobetalaktamaz türü (Sınıf A, Sınıf D) karbapenemaz varlığı düşünüldü (Tablo 9).

Tablo 9: eCIM sonuçlarının yorumlanması (45)

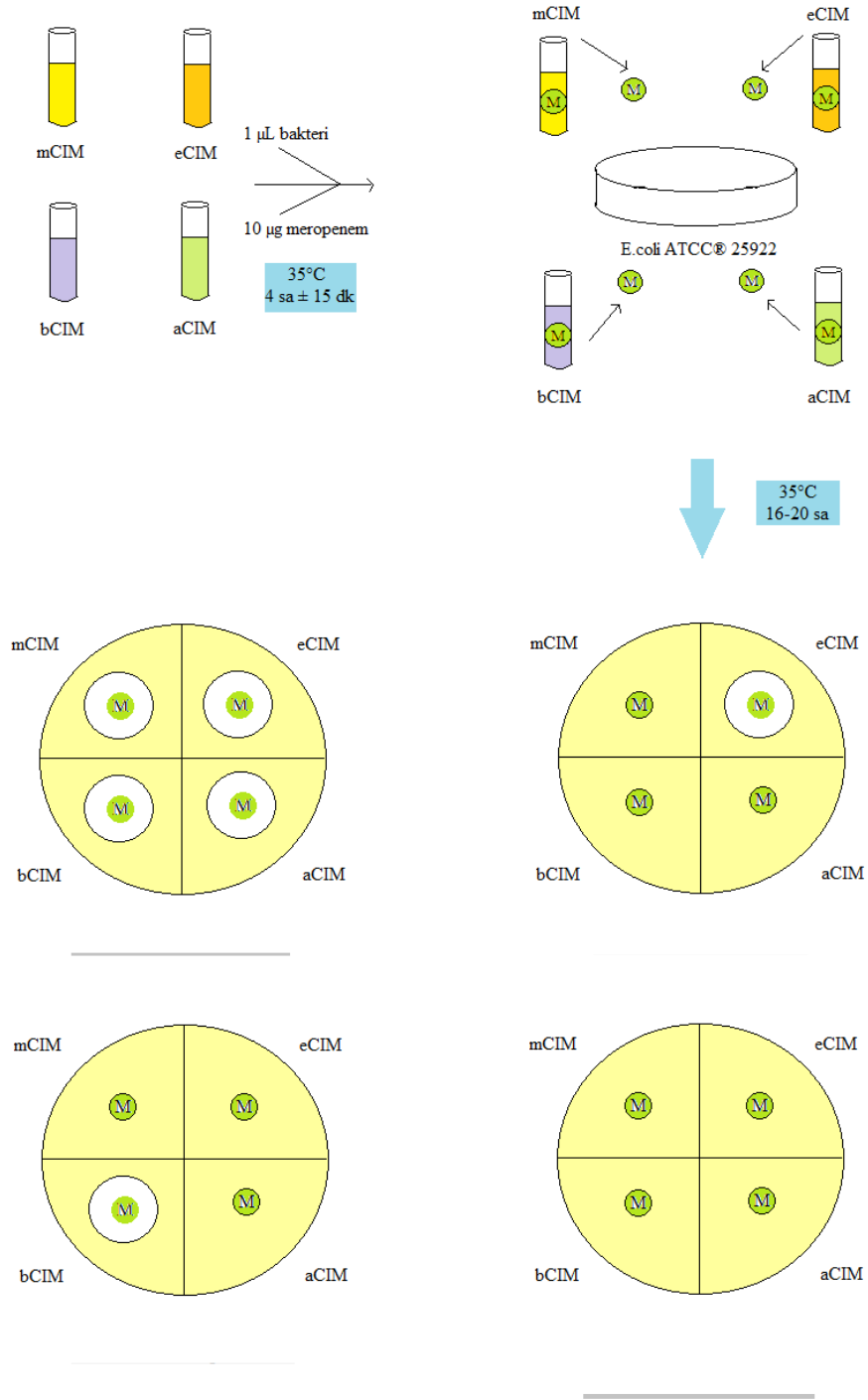
(MEM+EDTA)-(MEM) farkı	SONUÇ
≥ 5 mm	Metallobetalaktamaz
≤ 4 mm	Serin karbapenemaz

Fenilboronik asit (PBA) ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu (bCIM): Bu yöntem için birisinde 2 mL Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri içeren, diğesinde 2 mL TSB besiyerine ilaveten, 40 mg fenilboronik asitin (Glentham GK1609) 2 mL dimetilsülfoksit (DMSO)'te çözülmesiyle elde edilen PBA solüsyonundan (son konsantrasyon 20 mg/mL) 0,07 mL ilave edilmiş iki tüp kullanıldı. Her iki tüpe de test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 1 µL öze miktarı koloni eklendi. Hazırlanan bakteri süspansiyonları içerisine 10 µg meropenem diski eklenerek 35°C'lik etüvde 4 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası her iki meropenem diski, 0.5 MacFarland standardında hazırlanmış karbapenem duyarlı *E. coli* ATCC® 25922 bakteri süspansiyonu yayılmış olan MHA besiyerlerine yerleştirildikten sonra 35°C'lik etüvde 16-20 saat daha inkübasyona devam edildi. mCIM, eCIM ve bCIM testlerinin birleşiminden oluşan mCIMplus testi sonuçlarının yorumlanması Şekil 3'te gösterildi (12).

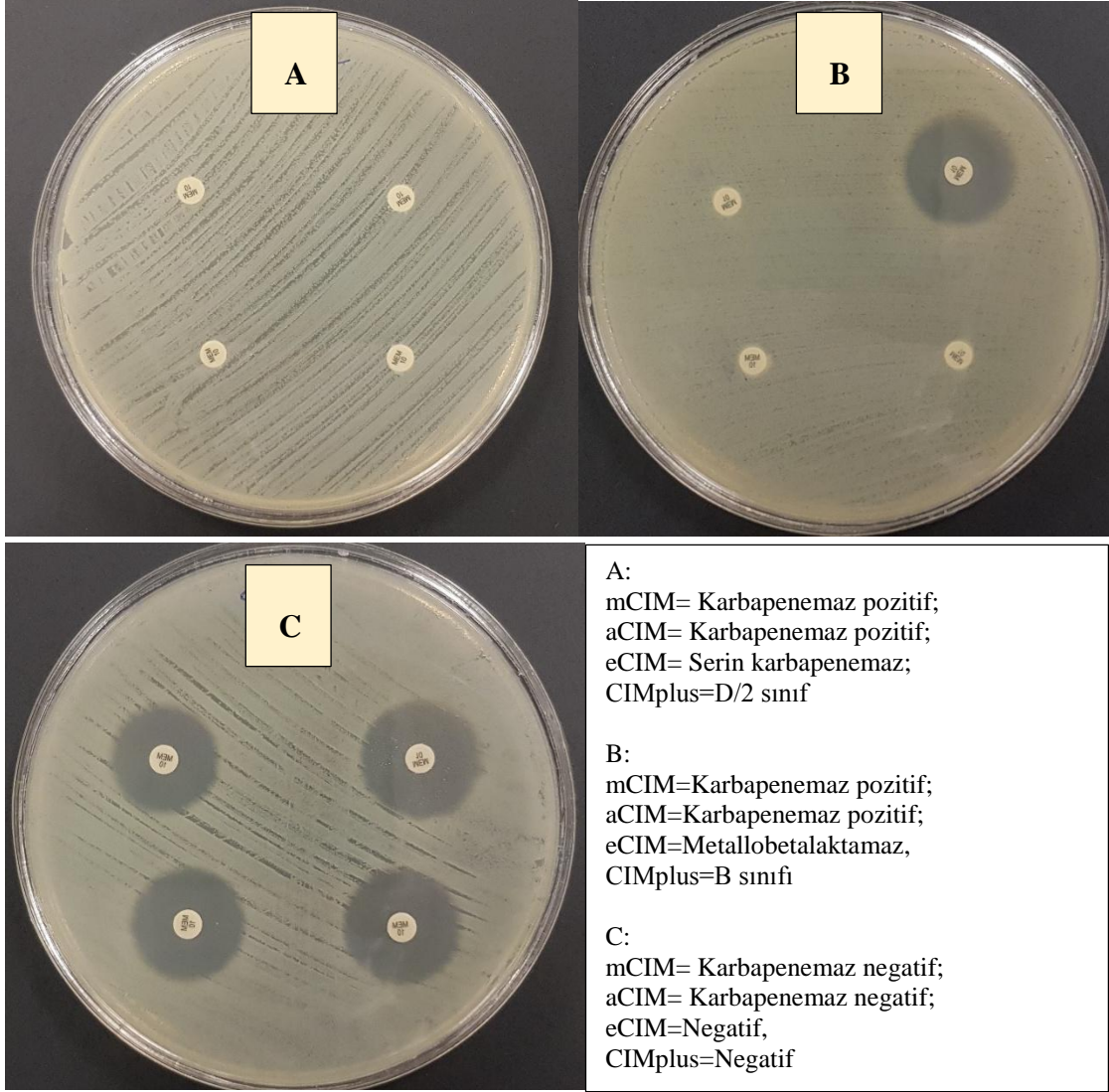


Şekil 3: mCIMplus sonuçlarının yorumlanması (12)

Modifiye karbapenem inaktivasyon yöntemlerinin çalışma ve değerlendirme aşamaları Şekil 4'te gösterildi. Plaklardaki zon çapları mCIM, aCIM, eCIM ve mCIMplus testlerinin yorumlama kriterlerine göre ayrı ayrı değerlendirildi (Şekil 5)



Şekil 4: Modifiye karbapenem inaktivasyon yöntemlerinin çalışılması ve değerlendirilmesi (Tsai et al. çalışmasındaki tablodan yararlanılarak hazırlanmıştır (10))



Şekil 5: mCIM, aCIM, eCIM ve CIMplus testleri yorumu

GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Çalışmamızda KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-51, OXA-23, OXA-58 ve OXA-48 karbapenemaz genlerinin tespiti için real time PCR yöntemi (gerçek zamanlı PZR) (Karbapenem Direnci qPCR Kiti, Bioeksen, Türkiye) kullanıldı. Öncesinde bakterilerden nükleik asit elde etmek için manyetik boncuk metoduyla ekstraksiyon yapan Hızlı Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (Bioeksen, Türkiye) Zybio EXM 3000 ile kullanıldı.

Stok solüsyonu içerisinde -80 °C’de saklanmış olan *K. pneumoniae* izolatları %5 koyun kanlı agar besiyerlerine ekilerek 36 °C’de 18-24 sa inkübe edildi. İnkübasyon sonrası koloniler saflık açısından kontrol edilip ekstraksiyon için işleme alındı. Üretici firma önerileri doğrultusunda MHB besiyerine 1 µL bakteri ilave edilip vortekslenerek homojenizasyon sağlandı. 14000 g’de 5 dk santrifüjlendikten sonra süpernatant dışarı atılıp pellet, boş bir ependorfa aktarıldı. Pelletin üzerine 180 µL STL-B (Stool Tris Lysis Buffer) solüsyonu ilave edilip vortekslendi. Ekstraksiyon kartuşunun 1. kuyucuğuna 15 µL Proteinaz-K pipetlenip üzerine elde edilen STL-B solüsyonu ve 14 µL 11XPEGN (Poly Ethylene Glycol + Azide) solüsyonu pipetlendi. Kartuşun 4. kuyucuğuna 500 µL Yıkama Tamponu (Wash Buffer) pipetlendi. Pipetleme işlemlerinden sonra kartuş cihaza yüklendi. İşlem sonrası nükleik asit ekstraktı elde edildi.

Elde edilen nükleik asit ekstraktı firma önerileri doğrultusunda gerçek zamanlı PZR yöntemiyle çalışıldı. Her çalışmada kit içeriğinde bulunan pozitif ve negatif kontroller çalışıldı.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler için SPSS for Windows version 20.0 paket programı kullanıldı. İki değişken arasındaki ilişkilerin belirlenmesinde çapraz tablolardan yararlanıldı. PZR sonuçları altın standart kabul edilerek kombine disk testi, modifiye karbapenem inaktivasyon metodu, EDTA ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu, fenilboronik asit ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu ve amonyum bikarbonat ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodlarının karbapenemazları belirlemedeki duyarlılık, özgüllük değerleri hesaplandı.

ETİK KURUL ONAYI VE PROJE DESTEĞİ

Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı’ndan 04.05.2021 tarihli karar ve E-46048792-050.01.04-34577 sayılı ile etik kurul onayı alındı. Çalışmamız Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinasyon birimi tarafından desteklenmiştir (BAP no: NKUBAP.02.TU.21.329, Proje başlangıç tarihi: 03.09.2021). Etik kurul onay belgesi Ek 1’de sunuldu.

BULGULAR

EUCAST 2021 rehberi karbapenemaz tarama kriterlerine göre 100 adet *K.pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edildi. İzolatların 75'i (%75) yoğun bakımlardan, 16'sı (%16) servislerden, 9'u (%9) polikliniklerden gönderilen örneklerden oluşmaktadır. İzolatların yıllara göre dağılımı Tablo 10'da gösterildi.

Tablo 10: İzolatların yıllara göre dağılımı

Yıl	Sayı (n)	Oran (%)
2018	21	21
2019	27	27
2021	52	52
Toplam	100	100

İzolatların gönderildikleri numune tipine göre dağılımı ise Tablo 11'de gösterildi. 2020 yılında COVID-19 pandemisinde yaşanan yoğunluk sebebiyle numune izole edilemedi.

Tablo 11: İzolatların numune türlerine göre dağılımı

Numune Türü	Sayı (n)	Oran (%)
İdrar	32	32
Trakeal aspirat	29	29
Kan	22	22
Yara	7	7
Balgam	5	5
Katater	4	4
Periton	1	1
Toplam	100	100

Çalışmamızdaki izolatların büyük çoğunluğu sırasıyla idrar, trakeal aspirat ve kan (%32, %29, %22) numunelerinden elde edildi. Poliklinik hastalarından izole edilen suşların tamamı idrar örneklerinde tespit edildi.

İzolatların PZR yöntemine göre genotipik karbapenemaz sonuçları Tablo 12’de gösterildi.

Tablo 12: İzolatların genotipik karbapenemaz direnç profilleri

Direnç türü	Sayı (n)	Oran (%)
NDM+OXA-48	40	40
OXA-48	32	32
KPC+OXA-48	5	5
VIM+OXA-48	4	4
NDM	3	3
KPC	2	2
NDM+OXA-51	2	2
OXA-51	1	1
VIM+OXA-51	1	1
KPC+OXA-51	1	1
OXA-48+OXA-51	1	1
OXA-48+OXA-23,OXA-58	1	1
Negatif	7	7
Toplam	100	100

İzolatların karbapenemaz varlığını tespit etmek için fenotipik yöntemlerden kombine disk yöntemi, mCIM ve aCIM yöntemleri çalışılıp duyarlılık ve özgüllük sonuçları açısından karşılaştırıldı. mCIM ve aCIM testleri, referans aralığı 19 mm ve 22 mm olarak iki farklı şekilde değerlendirildi. Kombine disk yöntemine göre karbapenemaz fenotipi değerlendirme sonuçları Tablo 13’de gösterildi.

Tablo 13: Kombine disk yöntemine göre direnç profili dağılımı

Karbapenemaz Varlığı	Direnç türü	Sayı (n)	Oran (%)	Toplam (n)
POZİTİF	OXA-48	66	66	95
	MBL+OXA-48	15	15	
	KPC	7	7	
	MBL	6	6	
	KPC+OXA-48	1	1	
NEGATİF	AmpC	2	2	5
	Negatif	3	3	

Kombine disk yöntemiyle karbapenemaz varlığı pozitif saptanan 95 izolattın 93'ü karbapenemaz enzimi bulundururken, yanlış pozitif değerlendirilen iki izolattan birisi KPC diğer OXA-48 olarak değerlendirildi. Kombine disk yönteminin karbapenemaz varlığı tespit etme konusundaki duyarlılığı %100, özgüllüğü %83 olarak bulundu.

mCIM ve aCIM testlerinin iki farklı değerlendirme kriterine göre pozitiflik sonuçları Tablo 14’te gösterildi.

Tablo 14: mCIM ve aCIM yöntemlerinin farklı değerlendirme yöntemlerine göre sonuçları

Karbapenemaz Varlığı	Karbapenemaz	n	mCIM		aCIM	
			Meropenem zon çapı (mm)		Meropenem zon çapı (mm)	
			<19	<22	<19	<22
POZİTİF	NDM+OXA-48	40	34	39	34	38
	OXA-48	34	26	29	27	30
	KPC+OXA-48	5	5	5	5	5
	VIM+OXA-48	4	4	4	4	4
	NDM	3	3	3	2	3
	KPC	2	2	2	2	2
	NDM+OXA-51	2	1	2	0	2
	OXA-51	1	0	0	0	0
	VIM+OXA-51	1	1	1	1	1
	KPC+OXA-51	1	1	1	1	1
	OXA-48+OXA-51	1	1	1	1	1
	OXA-48+OXA-23, OXA-58	1	0	1	0	1
NEGATİF		7	0	6	0	3
TOPLAM		100	78	94	77	91

Sayıda en fazla yanlış negatif sonucun NDM+OXA-48 ve OXA-48 izolatlarına ait olduğu görüldü. mCIM testinde sınır eşik değeri <22 mm yapıldığında; <19 mm sınır eşik

değerinde tespit edilemeyen beş NDM+OXA-48, üç OXA-48, bir NDM+OXA-51, bir OXA-48+OXA-23, OXA-58 izolatlarının tespit edilebildiği görüldü. Böylece testin duyarlılığı %83,8'den %94,8'e yükseldi. Ancak sınır eşik değeri artırıldığında yedi karbapenemaz bulundurmayan yedi izolatın altısı yanlış pozitif değerlendirildi. Bu sebeple sınır eşik değeri artırıldığında özgüllük değeri %100'den %34'e düştü. aCIM testinde sınır eşik değeri <22 mm yapıldığında; <19 mm sınır eşik değerinde tespit edilemeyen dört NDM+OXA-48, üç OXA-48, bir NDM, iki NDM+OXA-51, bir OXA-48+OXA-23, OXA-58 izolatlarının tespit edilebildiği görüldü. Bu durumda testin duyarlılığı %82,7'den %94,6'ya yükseldi. Sınır eşik değeri artırıldığında karbapenemaz bulundurmayan yedi izolatın üçü yanlış pozitif sonuçlandı. Bu nedenle testin özgüllüğü %100'den %57'ye düştü. Karbapenemaz varlığını tespit etmek açısından çalışılan fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük sonuçları Tablo 15'te gösterildi.

Tablo 15: Karbapenemaz tespiti açısından çalışılan fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

	Kombine Disk	mCIM		aCIM	
		<19 mm	<22 mm	<19 mm	<22 mm
Duyarlılık (%)	100	83,8	94,8	82,7	94,6
Özgüllük (%)	83,3	100	34	100	57

Karbapenemaz türünü tespit etmek açısından kombine disk yöntemi, eCIM ve CIMplus (mCIM, eCIM ve bCIM kombinasyonu) yöntemleri çalışıldı. eCIM testi 19 mm ve 22 mm referans aralıklarına göre iki farklı değerlendirme kriterine göre değerlendirildi.

Kombine disk yönteminin direnç genlerini tespit etmek konusundaki duyarlılık ve özgüllük sonuçları Tablo 16’da gösterildi.

Tablo 16: Kombine disk yönteminin karbapenemaz türünün tespiti açısından duyarlılık ve özgüllük sonuçları

KOMBİNE	GP	YN	GN	YP	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
NDM+OXA-48	40 ^a	0	-	-	100	-
OXA-48	32 ^b	0	-	-	100	-
KPC+OXA-48	5 ^c	0	-	-	100	-
VIM+OXA-48	4 ^d	0	-	-	100	-
NDM	3 ^e	0	-	-	100	-
KPC	2	0	-	-	100	-
NDM+OXA-51	2 ^f	0	-	-	100	-
OXA-51	1 ^g	0	-	-	100	-
VIM+OXA-51	1	0	-	-	100	-
KPC+OXA-51	1 ^h	0	-	-	100	-
OXA-48+OXA-51	0	1 ⁱ	-	-	0	-
OXA-48+OXA-23, OXA-58	1	0	-	-	100	-
Negatif	-	-	5 ^j	2	-	71,4
TOPLAM	92	1	5	2	98,9	71,4

^a İki izolat kombine disk yönteminde MBL, otuz izolat OXA-48 olarak bulundu.

^b İki izolat kombine disk yönteminde MBL+OXA-48 olarak bulundu.

^c Bir izolat kombine disk yönteminde OXA-48, üç izolat KPC olarak bulundu.

^d Bir izolat kombine disk yönteminde MBL, bir izolat OXA-48 olarak bulundu.

^e Bir izolat kombine disk yönteminde MBL+OXA-48 olarak bulundu.

^f Bir izolat kombine disk yönteminde MBL+OXA-48, bir izolat da OXA-48 olarak bulundu.

^g Kombine disk yönteminde OXA-48 olarak bulundu ve pozitif kabul edildi.

^h Kombine disk yönteminde KPC olarak bulundu.

ⁱ Kombine disk yönteminde MBL olarak bulundu.

^j İki AmpC sonucu da karbapenemaz üretimi olmadığı için negatif olarak kabul edildi.

(-) Pozitif izolatlar ile duyarlılık, negatif izolatlar ile özgüllük hesapları yapıldı.

eCIM testinin iki farklı değerlendirme kriterine göre direnç genlerini tespit etmek konusundaki duyarlılık ve özgüllük sonuçları Tablo 17 ve Tablo 18’de gösterildi.

Tablo 17:Farklı direnç genlerinin eCIM (19mm) testine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları

Ambler Sınıfı	Karbapenemaz Türü	GP	YN	GN	YP	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
B Sınıfı (Metallo-beta-laktamaz)	NDM+OXA-48	34	6	-	-	85	-
	VIM+OXA-48	4	0	-	-	100	-
	NDM	3	0	-	-	100	-
	NDM+OXA-51	1	1	-	-	50	-
	VIM+OXA-51	1	0	-	-	100	-
B Sınıfı Dışı (Serin karbapenemaz)	OXA-48	-	6	5	21	-	19,2
	KPC+OXA-48	-	-	5	0	-	100
	KPC	-	-	2	0	-	100
	OXA-51	-	1	0	0	-	100
	KPC+OXA-51	-	-	1	0	-	100
	OXA-48+OXA-51	-	-	0	1	-	0
	OXA-48+OXA-23, OXA-58	-	-	1	0	-	100
	Negatif	-	-	7	0	-	100
TOPLAM		43	14	21	22	75,4	48,8

32 adet OXA-48 izolatından beşi serin karbapenemaz sınıfına dahil edilerek doğru tanımlanırken, 21 adedi B sınıfına dahil edilerek yanlış pozitif, altısı ise karbapenemaz negatif olarak tespit edildi.

Tablo 18: Farklı direnç genlerinin eCIM (22mm) testine göre duyarlılık ve özgüllük sonuçları

Ambler Sınıfı	Karbapenemaz Türü	GP	YN	GN	YP	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
B Sınıfı (Metallo-beta-laktamaz)	NDM+OXA-48	33	7	-	-	82,5	-
	VIM+OXA-48	4	0	-	-	100	-
	NDM	3	0	-	-	100	-
	NDM+OXA-51	1	1	-	-	50	-
	VIM+OXA-51	1	0	-	-	100	-
B Sınıfı Dışı (Serin karbapenemaz)	OXA-48	-	-	11	21	-	34,3
	KPC+OXA-48	-	-	5	0	-	100
	KPC	-	-	5	0	-	100
	OXA-51	-	-	1	0	-	100
	KPC+OXA-51	-	-	1	0	-	100
	OXA-48+OXA-51	-	-	0	1	-	0
	OXA-48+OXA-23, OXA-58	-	-	1	0	-	100
	Negatif	-	-	1	6	-	14,2
TOPLAM		42	8	22	28	84	44

Sınır eşik değeri 22 mm olarak belirlendiğinde, 19 mm’de karbapenemaz negatif kabul edilen altı izolat, serin karbapenemaz sınıfına dahil olarak doğru tanımlandı. CIMplus yönteminin karbapenemaz sınıflarının tespiti açısından duyarlılık ve özgüllük sonuçları Tablo 19’da gösterildi.

Tablo 19: CIMplus testinin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

Ambler Sınıfı	Karbapenemaz Türü	GP	YN	GN	YP	Duyarlılık (%)	Özgüllük (%)
A	KPC	0	2	-	-	0	-
B	NDM	2	1	-	-	66,6	-
D	OXA-48	2	30	-	-	6,2	-
	OXA-51	0	1	-	-	0	-
2 Sınıf	NDM+OXA-48	7	33	-	-	17,5	-
	KPC+OXA-48	5	0	-	-	100	-
	VIM+OXA-48	4	0	-	-	100	-
	NDM+OXA-51	0	2	-	-	0	-
	VIM+OXA-51	1	0	-	-	100	-
	KPC+OXA-51	1	0	-	-	100	-
	OXA-48+OXA-51	0	1	-	-	0	-
	OXA-48+OXA-23,OXA-58	0	1	-	-	0	-
	Negatif	-	-	7	0	-	100
	TOPLAM	22	71	7	0	23	100

KPC izolatlarının her ikisi D/2 Sınıf; NDM izolatlarından birisi negatif; OXA-48 izolatlarından biri A sınıfı, üçü B sınıfı, dokuzu negatif, 17'si güvenilir; OXA-51 izolatı negatif; NDM+OXA-51 izolatları negatif; NDM+OXA-48 izolatlarından biri A sınıfı, 18'i negatif, 14'ü güvenilir; OXA-48+OXA-51 ve OXA-48+OXA-23, OXA-58 izolatları da negatif olarak tespit edildi. Tüm izolatlar içerisinde 31 izolat hem EDTA'lı hem de PBA'lı disk çevresinde >10 mm inhibisyon zonu oluşturarak sonucu "güvenilmez" olarak değerlendirildi.

Karbapenemaz türünü tespit etmek açısından çalışılan fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllük sonuçları Tablo 20’de gösterildi.

Tablo 20: Karbapenemaz türü tespitinde kullanılan testlerin duyarlılık ve özgüllüklerinin karşılaştırılması

	Kombine	eCIM		CIMplus
		<19 mm	<22 mm	
Duyarlılık (%)	98,9	75,4	84	23
Özgüllük (%)	71,4	48,8	44	100

TARTIŞMA

Antimikrobiyal ilaç direnci, tüm dünyada artan mortalite ve morbiditeyle sonuçlanan ciddi durumlara yol açmaktadır. Bu direnç profillerinin takip edilerek gerekli önlemlerin alınması için çeşitli sürveyans ağları oluşturulmuştur. Bu ağlardan birisi, ülkemizin de dahil olduğu CAESAR sürveyans ağıdır. *Enterobacteriaceae* ailesindeki karbapenem direnci de bu kapsamda takip edilmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinden *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının belirli antibiyotiklere karşı direnç oranları yıllık olarak bildirilmektedir. CAESAR 2020 raporunda *E. coli* için sırasıyla ertapenem ve imipenem/meropenem dirençleri %9 ve %3 iken bu oranlar *K. pneumoniae* için %51 ve %39 olarak belirlenmiştir (5). Rodríguez-Baño et al. yaptıkları çalışmada en sık karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'nin *K. pneumoniae* olduğunu belirtmişlerdir (71). Bu sebeple KDE'leri temsilen çalışmamıza *Enterobacteriaceae* ailesinden 100 *K. pneumoniae* izolatını dahil edildi.

Karbapenemlerin son seçenek tedavisi olması ve hastanede yatırılarak tedavisinin uygulanması sebebiyle KDE'ler genel olarak hastane kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Hatta plazmidler aracılığıyla hastalar arası hızla yayılabilmekte ve salgınlara sebep olabilmektedir (30, 31, 42). Nordmann et al. KDE'lerin sadece hastane kaynaklı değil, toplumdan da izole edilebildiğini belirtmişlerdir (26). Bizim de çalışmamızda izolatların büyük çoğunluğu hastaneden, özellikle yoğun bakım servislerinden izole edilmekle birlikte %9'luk bir kısmı da ayaktan hastalardan izole edildi.

Numunelerin yıllara göre dağılımını incelediğimizde numunelerin %52'sinin 2021 yılına ait olduğu görüldü. Bu duruma KDE oranlarının da ülkemizde giderek artması sebep olmuş olabilir. ECDC'nin son raporuna göre ülkemizde KDE sıklığı 2018 yılında %34,4, 2019 yılında %39,4, 2020 yılında %48,2 olarak belirtilmiştir (7). Çalışmamızın numune dağılımı da

bu verilere paralel olarak artarak 2018 yılında %21, 2019 yılında %27, 2021 yılında %52 olarak tespit edildi.

Schwaber et al. yatan hastalarda karbapenem dirençli *K. pneumoniae* bulaşının risk faktörlerini araştırmışlar; yoğun bakımda kalmanın ve foley katater kullanımının enfeksiyon riskini artırdığını tespit etmişlerdir (1). Patel et al. mekanik ventilasyon ve santral venöz katater kullanımının karbapenem dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyon riskini artırdığını göstermişlerdir (2). Örneklemimizin büyük çoğunluğunun yoğun bakım hastalarından oluşması ve idrar, trakeal aspirat, kan numunelerinden izole edilmesinin sebebinin bu olabileceği düşünüldü. Polikliniklerden izole edilen suşların tümünün idrar numunelerinde görülmesinin nedeninin ayaktan takip edilen daimi sondalı hastalar olduğu düşünüldü.

Karbapenemazlar, tüm beta laktam antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaları ve beraberinde sıklıkla başka direnç genlerini de taşımaları sebebiyle çoklu ilaç direncine sebep olabilmektedir (70). Aynı zamanda karbapenemaz üreten izolatların hastalar arası hızlı yayılımı, hastanede kalış süresinin uzamasına, morbidite ve mortalitenin artmasına sebep olmaktadır. Borer et al. yaptıkları çalışmada KDE'ye bağlı mortalite oranını %71,9, Schwaber et al. karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarına bağlı mortalite oranını %44 olarak tespit etmişlerdir (1, 32). Solgi et al. özellikle NDM ve OXA-48 genlerinin yayılımında yatay gen transferinin önemini vurgulamış, hastaneye sürekli giriş çıkış yapılması ve sık seyahat edilmesiyle toplumda da yaygınlaşabileceğini belirtmişlerdir (3). Bu sebeple bu izolatların hızlı tespiti, gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve halk sağlığının korunması açısından oldukça önemlidir.

Enterobacteriaceae'larda karbapenemlere karşı duyarlılığın azaldığı durumlarda karbapenemaz varlığı araştırılmalıdır. Bu amaçla meropenem MİK'lerinin kullanımı duyarlılık ve özgüllük açısından en iyi sonuçları vermektedir. Yapılan çalışmalarda ertapenemin duyarlılık sonuçları iyi fakat özgüllüğü düşük bulunmuştur (70). Bu çalışmada EUCAST 2021 kriterlerine uyarak disk difüzyon yönteminde meropenem inhibisyon zon çapı <28 mm veya otomatize sistem antibiyogram sonucuna göre MİK değeri >0.125 mg/L olan izolatları karbapenemaz varlığı açısından değerlendirildi. EUCAST, izolatların rutin duyarlılık testlerinde karbapenem duyarlılığında azalma tespit ettikten sonra, karbapenemaz varlığını tespit etmek açısından fenotipik testlerin çalışılmasını önermektedir (70). Bu amaçla öncelikle izolatlarımıza kombine disk yöntemi çalışıldı. Bu yöntemle bir direnç paterni tespit edilen izolatlar çalışmamıza dahil edildi. Bu izolatlara aynı zamanda fenotipik yöntemlerden mCIM,

aCIM, eCIM ve CIMplus yöntemleri de çalışıldı. Gen varlıklarını saptamak için PZR yöntemi çalışılarak, çalışma sonuçları karşılaştırıldı.

Karbapenemaz varlığını tespit etmek açısından izolatlarımıza kombine disk yöntemi, mCIM ve aCIM testlerini çalışarak sonuçlar karşılaştırıldı. Tsakris et al. meropenem diskine PBA, EDTA, PBA+EDTA ilave ederek karbapenemaz varlığı ve türüne baktıkları çalışmada KPC, MBL ve KPC+MBL tespitindeki duyarlılıklarını sırasıyla %100, %100, %96,8 olarak tespit etmişlerdir (72). Çalışmamızda kombine disk metodunun KPC ve MBL tespitinin duyarlılıkları %100 olarak saptandı. İzolatlarımız arasında KPC+MBL izolatı bulunmuyordu. Bartolini et al. da 108 *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenemaz tespiti açısından altı fenotipik yöntemi karşılaştırdıkları çalışmada kombine disk yönteminin duyarlılığını %95, özgüllüğünü %99 olarak tespit etmişlerdir. Çalışmalarında KPC, NDM ve OXA-48 izolatlarının tümü %100 tanımlanırken, beş VIM izolatından ikisi tanımlanamamış, VIM+KPC enzimlerini bulunduran üç izolat da tanımlanamamıştır (46). Bizim çalışmamızda da KPC, NDM ve OXA-48 izolatlarının tümü %100 tanımlandı. Fakat üç NDM izolatından biri ve 32 OXA-48 izolatından ikisi kombine disk yönteminde MBL+OXA-48 olarak tespit edildi. İzolatlarımız arasında VIM+KPC enzimi bulunduran izolat yoktu. Ancak çift direnç enzimi bulunduran izolatları incelediğimizde 55 izolatın 13'ü tam ve doğru tanımlanırken, 41'inin içerdiği enzimlerden yalnızca birisi tespit edilerek eksik tanımlandı. Yine aynı çalışmada çoklu direnç profillerinde fenotipik testlerin yanıltıcı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Miriagou et al. da 125 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatında kombine disk yöntemiyle karbapenemaz araştırdıkları çalışmalarında çift karbapenemaz enzimi bulunduran izolatların enzimlerden birinde veya her ikisinde yalancı negatif sonuçlar tespit ettiklerini ifade etmişlerdir (47). Bizim de çalışmamızın sonuçları bu sonucu desteklemektedir. OXA-48+OXA-51 enzimlerini bulunduran bir izolatımız ve PZR ile herhangi bir enzim bulunmadığı gösterilen izolatlardan birisi de kombine disk yönteminde MBL olarak tespit edildi. Us ve ark. yaptıkları çalışmada 83 OXA-48 enzimi bulunduran izolattan 3'ünü kombine disk yöntemiyle MBL olarak tespit etmişlerdir (73). Benzer şekilde Giske et al. 34 KPC üreten izolatın dördünü, dokuz OXA-48 üreten izolatın dördünü, dokuz GSBL üreten izolatın birini MBL olarak tespit etmişlerdir (74). Her ikisi de sonuç olarak EDTA sinerjisi konusunda yanlış pozitiflikler olabileceği, bunun da özgüllüğü düşürebileceği hususunda uyarılmışlardır. Çalışmamızın bu iki yanlış pozitif sonucunun bununla ilgili olduğu düşünüldü. Sattler et al. üç farklı markaya ait kombine disk yöntemini karşılaştırdıkları çalışmada Liofilchem markasının duyarlılığını %96, özgüllüğünü %87 olarak tespit etmişlerdir (75). Bizim de bu çalışmaya benzer olarak karbapenemaz tespiti

açısından duyarlılık ve özgüllüğümüz %100 ve %83,3'tür. Fakat karbapenemaz türünü tespit etmek açısından özgüllüğü %71,4 olarak belirlendi. Bu duruma MBL ve çift karbapenemaz içeren izolatlarımızın sayıca fazla olmasının yol açtığını düşünüldü.

CLSI M100 S28'de, yapılan çalışmalar sonucu mCIM testinin duyarlılık ve özgüllüğünün >%99 olduğu belirtilmiştir (45). Tsai et al. da çalışmaları sonucu mCIM testinin duyarlılık ve özgüllüğünü %100 olarak tespit etmişlerdir (10). Gelmez ve ark. ise yaptıkları çalışmada özgüllüğü %100 bulmasına karşın, duyarlılığı daha düşük olarak saptamış ve %81.95 olduğunu belirtmişlerdir. Enzim açısından sonuçları detaylandırıdıklarında duyarlılığın düşmesine sebep olan enzim gruplarının sırasıyla OXA-48 ve NDM olduğunu tespit etmişlerdir (11). Yapılan çalışmalarda fenotipik testlerle karbapenemaz varlığını saptamada OXA-48 ve NDM enzimlerinin güçlük oluşturduğu, özellikle birlikte bulunduğu durumlarda yanlış negatif sonuçlara yol açarak duyarlılığı düşürebildiğini belirtmişlerdir (50) (76). Çalışmamızda Gelmez ve ark.'larının yaptıkları çalışmaya benzer olarak mCIM testinin duyarlılığı %83,8, özgüllüğü %100 olarak tespit edildi. Sonuçlar detaylandırıldığında yanlış negatif sonuçların şu enzim gruplarına ait olduğu belirlendi; OXA-48 (26/32), OXA-51 (0/1), NDM+OXA-51 (1/2), NDM+OXA-48 (34/40), OXA-48+OXA-23, OXA-58 (0/1). Bulgularımız bu açıdan da önceki çalışmalara benzerdir.

Yapılan çalışmalar, bikarbonatın OXA tipi enzimlerin aktif bölgesindeki karboksilatlanmış lizin kalıntılarının aktivitesini artırdığını, bu sebeple meropenem hidrolizine dayalı karbapenemaz varlığını tespit eden çalışmalara bikarbonat ilavesinin OXA tipi enzimlerin tespitinin kolaylaştırdığını göstermiştir (61, 77). Gelmez ve ark. da mCIM testine amonyum bikarbonat ilave ederek sonuçları karşılaştırmış, duyarlılığın %89,47'ye özgüllüğün %95,49'a yükseldiğini tespit etmişlerdir (11). Çalışmamızda amonyum bikarbonat ilavesi sonrası duyarlılık hemen hemen aynı kaldı (%82,7), özgüllük ise %100 olarak saptandı. mCIM'dan farklı olarak bir OXA-48 izolatı daha tespit edilebildi, fakat iki NDM izolatı yalancı negatif olarak sonuçlandı. Gelmez ve ark. çalışmalarında bir de meropenem zon çapı sınır eşiğini 19 mm yerine, EUCAST meropenem duyarlılık sınır eşiğine uyarak 22 mm olarak değerlendirip sonuçları karşılaştırmışlardır. mCIM <22 mm sınır eşik değeriyle değerlendirildiğinde özgüllük %100 olarak kalırken, duyarlılığın %91,73'e çıktığını tespit etmişlerdir. aCIM testini <22 mm sınır eşik değeriyle değerlendirdiklerinde yine özgüllük %100 olarak kalırken, duyarlılığın %89,47'den %95,49'a yükseldiğini görmüşlerdir. Sonuç olarak da aCIM testinin <22 mm olarak değerlendirilmesinin karbapenemaz tespiti açısından

en doğru ve güvenilir sonuçları verdiğini ifade etmişlerdir (11). Çalışmamızda hem mCIM hem de aCIM testleri her iki sınır eşik değerine göre değerlendirilip sonuçlar karşılaştırıldığında amonyum bikarbonat ilavesinin sonuçları anlamlı olarak değiştirmedeği tespit edildi. Sınır eşik değeri <22 mm olarak değerlendirildiğinde duyarlılığın her iki testte de arttığı, fakat yanlış pozitif sonuçların oluşmasıyla birlikte özgüllüğün düştüğü tespit edildi.

Karbapenemaz varlığını tespit etmek amacıyla fenotipik yöntemler karşılaştırıldığında duyarlılık açısından mCIM ve aCIM testlerinin 22 mm sınır eşik değerine göre değerlendirme sonuçlarının, 19 mm sınır eşik değeri değerlendirme sonuçlarına göre daha iyi olduğu görüldü. Örneklem seçimimizi kombine disk yöntemi sonuçlarına göre yaptığımız için kombine disk yönteminin duyarlılığı görece daha yüksek tespit edildi. Bununla birlikte yapılan diğer çalışmalardaki kombine disk yönteminin duyarlılık sonuçları göz önünde bulundurulduğunda ve testler maliyet etkinlik sonuçları açısından değerlendirildiğinde mCIM ve türevlerinin kombine disk yönteminin yerine tercih edilebilir olduğunu düşünüyoruz. mCIM ve aCIM testlerinin 19 mm sınır eşik değerine göre değerlendirildiğinde özgüllük sonuçları %100 iken sınır eşik değeri 22 mm'ye çekildiğinde yanlış pozitif sonuçların artmasıyla birlikte özgüllüğün düştüğü gözlemlendi. Bu farklılık, örneklemimizdeki karbapenemaz enzimi bulunmayan izolat sayısının az olmasından kaynaklanmış olabilir. Mevcut veriler göz önünde bulundurulduğunda 22 mm sınır eşik değeri değerlendirme kriter sonuçlarının doğrulama amacıyla kullanılamayacağını düşünmekteyiz. Duyarlılık ve özgüllük sonuçları birlikte değerlendirildiğinde kombine disk yönteminin mCIM ve türevlerine göre daha doğru sonuç verdiği gözlemlendi.

CLSI M100 S28'de metallo betalaktamazları serin karbapenemazlardan ayırt etmek için eCIM yöntemi önerilmiş, yapılan çeşitli çalışmalarda duyarlılığının >%95, özgüllüğünün >%92 olduğu belirtilmiştir (45). Tsai et al. 195 *Enterobacteriaceae* izolatında yaptıkları çalışmada testin duyarlılığını %89.3, özgüllüğünü %98.7 olarak tespit etmişlerdir (10). Çalışmamızda eCIM testini de 19 mm ve 22 mm sınır eşik değerlerine göre değerlendirdik. Önerilen sınır eşik değeri olan 19 mm'ye göre değerlendirildiğinde duyarlılığı %86, özgüllüğü %56 olarak tespit edildi. Sınır eşik değeri 22 mm'ye çektiğimizde ise mCIM testinde olduğu gibi duyarlılığın artıp özgüllüğün düştüğü gözlemlendi (%84, %44). Tsai et al. yaptıkları çalışmada 7 IMP izolatından birinin, 3 NDM+OXA-48 izolatından 2'sinin yanlış negatif sonuçlanması sebebiyle duyarlılıklarının düştüğünü tespit etmişlerdir (10). Çalışmamızda benzer olarak 40 NDM+OXA-48 izolatından 6'sının, 2 NDM+OXA-51 izolatından birisinin yanlış negatif

olarak sonuçlanması sebebiyle duyarlılık sonuçlarının düştüğü tespit edildi. Tsai et al. 41 OXA-48 izolatından birisinin yanlış pozitif sonuçlanması sebebiyle özgüllük değerinin düştüğünü saptamışlardır (10). Bizim de çalışmamızdaki yanlış pozitif sonuçlar, OXA-48 enzimi içeren izolatlara aitti. 32 OXA-48 izolatından 21'i ve bir OXA-48+OXA-51 üreten izolat yanlış pozitif sonuçlandı.

eCIM testini 22 mm'ye göre değerlendirdiğimizde, 19 mm sonuçlarına göre negatif olarak saptanan 6 OXA-48, 1 OXA-51 izolatı gerçek negatif sınıfına dahil olduğu için duyarlılığı bir miktar arttı. eCIM, mCIM, aCIM testleri 22 mm'ye göre değerlendirildiğinde OXA türü enzimlerin doğru tespitini sağlasa da yanlış pozitif sonuçların artması bu metodun dezavantajını oluşturmaktadır.

Caméléna et al. karbapenemazları tespit etmek ve Ambler sınıflandırmasına göre karakterize etmek için 110 KDE izolatı ile CIM testine EDTA ve PBA ilave ederek CIMplus testini çalışmışlar. Testin duyarlılığını %97,8, özgüllüğünü %94,4 olarak tespit etmişlerdir (9). Petit et al. da aynı amaçla 137 karbapenemaz üreten ve 22 karbapenemaz üretmeyen *Enterobacteriaceae* izolatı ile CIM testi yerine mCIM testini EDTA ve PBA ilaveleriyle mCIMplus yöntemini çalışmışlar. Testin duyarlılığını %98,5, özgüllüğünü %100 olarak tespit etmişlerdir (12). Çalışmamızda duyarlılığı diğer iki çalışmanın aksine daha düşük olarak %23, özgüllüğü ise benzer olarak %100 olarak tespit edildi. Test sonuçları irdelendiğinde oransal olarak en fazla yanlış negatif sonucun OXA-48 ve NDM+OXA-48 izolatlarına bağlı olduğu görüldü. Yanlış negatif sonuçlar detaylandırıldığında 32 OXA-48 izolatın 17'si, 40 NDM+OXA-48 izolatın ise 14'ü hem EDTA'lı diskte hem de PBA'lı diskte >10 mm inhibisyon zonu oluşturarak “güvenilmez” olarak değerlendirildi. İzolatların %31'inin sonucunun bu şekilde olmasının duyarlılık sonucunu düşürdüğü kanısındayız. OXA-48 enziminin spesifik inhibitörünün olmaması ve örneklemimizin %88'inde OXA sınıfı enzim bulunması duyarlılığı daha düşük saptamamıza sebep olmuş olabilir. Çalışmamızda PBA diski çevresinde inhibisyon zonu oluşturması beklenen iki KPC izolatının hiçbir diskinin etrafında inhibisyon zonu oluşmadı. Bu sebeple bizim çalışmamız için PBA ilavesinin anlamlı bir katkısı olmadı. Fakat bu duruma Sınıf A enzimi içeren izolat sayısının az olması sebep olmuş olabilir. Daha yüksek sayılı izolatla çalışma yapılması faydalı olacaktır. Ayrıca 55 çift direnç enzimi içeren izolatımızdan yalnızca altısı “D/2 Sınıf” kısmına dahil olmuştur. İzolatların 22'si negatif, 31'i ise güvenilir olarak sonuçlanmıştır. Bu testin çift direnç enzimi içeren izolatlar için güvenilir sonuç vereceğini düşünmüyoruz.

Karbapenemaz türünü tespit etmek için çalışılan yöntemler karşılaştırıldığında en yüksek duyarlılık sonucunu kombine disk yönteminde elde edildi. Bu duruma örneklem seçim yöntemimiz sebep olmuş olabilir. eCIM test sonuçlarında, inhibisyon zon çapı eşik değeri 19 mm'den 22 mm'ye artırıldığında tıpkı mCIM ve aCIM testlerinde olduğu gibi duyarlılığın artmasıyla birlikte özgüllüğün düştüğü görüldü. CIMplus yönteminin duyarlılığı diğer iki testten de düşük saptandı. Bu testin A ve D gruplarını ayırması gibi bir avantajı olması beklenirken bizim çalışmamızda istenen etkinlik sağlanamadı. eCIM ve CIMplus testlerinin her ikisinde de tespit konusundaki en çok hata OXA-48 ve NDM+OXA-48 izolatlarında olduğu görüldü. Ülkemiz gibi OXA sınıfı enzimler açısından endemik bulunan bölgelerde, fenotipik test açısından kombine disk metodunun eCIM ve CIMplus yöntemlerinden daha faydalı olduğunu düşünüyoruz.

SONUÇ

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'lar sağlık kuruluşlarında ve toplumda hızla yayılarak halk sağlığını tehdit etmektedir. İzolatların hızla tespit edilip gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gereklidir. Bu sebeple hızlı ve doğru tespitinin yaygınlaşması oldukça önemlidir. Bu izolatların belirlenmesi için direnç genlerinin gösterilmesi tanıda altın standarttır. Fakat yüksek maliyet, deneyimli personel ve donanımlı laboratuvar gerektirmesi sebebiyle yaygın kullanımı sınırlanmaktadır. Çalışmamızda daha yaygın ve kolay kullanılabileceğini düşündüğümüz fenotipik testlerden kombine disk yöntemi, mCIM, aCIM, eCIM ve CIMplus testleri karşılaştırıldı. Karbapenemaz varlığını tespit etmek açısından kombine disk yönteminin duyarlılığı mCIM ve aCIM testlerinden daha yüksek tespit edildi. Kombine disk metodunda oluşan yanlış pozitiflikler sebebiyle özgüllüğü bu iki testten daha düşük tespit edildi. mCIM ve aCIM testlerinin inhibisyon zon eşik değeri 22 mm'ye çekildiğinde ise duyarlılığın düşüp, özgüllüğün yükseldiği görüldü. Bu sebeple önerilen zon eşik değerinin (19 mm) daha doğru sonuçlar vereceği düşünüldü. Karbapenemaz türünü tespit etmek amacıyla çalışılan kombine disk yöntemi, eCIM ve CIMplus yöntemleri karşılaştırıldığında performans bakımından en iyi sonuçların kombine disk metoduyla elde edildiği görüldü. eCIM ve CIMplus testlerinin OXA-48 ve NDM+OXA-48 izolatlarını tanımlama konusunda yetersiz olduğu görüldü. Sonuç olarak ülkemiz gibi özellikle bu enzimlerin yaygın olduğu bölgelerde hem karbapenemaz varlığını hem de türünü doğru tespit etmek açısından en uygun fenotipik testin kombine disk yöntemi olduğunu düşünüyoruz.

ÖZET

Enterobacteriaceae ailesi hem toplum kaynaklı basit enfeksiyonların hem de hastane ile ilişkili komplike enfeksiyonların etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Günümüzde *Enterobacteriaceae*'lar için son seçenek tedavilerden birisi olan karbapenemlere karşı direnç hem artmakta hem de yaygınlaşmaktadır. KDE izolatlarının hızlı yayılımı ve etken olduğu enfeksiyonlara bağlı morbidite, mortalitenin artışı sebebiyle dünya genelinde sürveyans ağları oluşturulmuştur. Buradan elde edilen veriler KDE izolatlarının sağlık hizmeti veren kuruluşlarda hastalar arası horizontal olarak yayılımı ve artık toplumda da yayılarak halk sağlığını tehdit etmekte olduğu konusunda uyarılmaktadır. Bu sebeple bu izolatların hızlı ve doğru tespiti, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınarak yayılımını önlemede kritik role sahiptir. KDE'lerin en sık sebebi karbapenemaz üretimidir. Karbapenemazların tanısında fenotipik yöntemler ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler tanıda altın standart olmasına rağmen deneyimli personel, maliyet ve donanımlı gereksinimleri sebebiyle yaygın olarak kullanılamamaktadır. Biz de çalışmamızda tanıda kullanılan fenotipik testlerin performanslarını değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmaya 2018-2021 yılları arasında hastanemizin çeşitli kliniklerinden laboratuvarımıza gönderilen örneklerden izole edilen 100 *K. pneumoniae* izolatı dahil edildi. Karbapenemaz tarama kriteri olarak EUCAST 2021 kriterleri kullanıldı. İzolatlara karbapenemaz varlığını tespit etmek için kombine disk yöntemi, mCIM ve aCIM testleri yapıldı. mCIM ve aCIM testleri 19 ve 22 mm inhibisyon zon çapı sınır eşik değerlerine göre ayrı ayrı değerlendirildi. Karbapenemaz türünü tespit etmek için kombine disk yöntemi, eCIM ve CIMplus yöntemleri çalışıldı. İzolatların her birine gerçek zamanlı PZR ile direnç gen tespiti

yapıldı. Çalışılan fenotipik yöntem sonuçları, PZR sonuçları ile karşılaştırılarak performans değerlendirildi.

Karbapenemaz tespitinde kombine disk yöntemi, mCIM-19 mm, mCIM 22 mm, aCIM-19 mm, aCIM-22 mm testlerinin sırasıyla duyarlılıkları %100, %83,8, %94,8, %82,7, %94,6; özgüllüklerini ise %83,3, %100, %34, %100, %57 olarak tespit edildi. Karbapenemaz tür tespiti amacıyla çalışılan kombine disk yöntemi, eCIM-19 mm, eCIM-22 mm, CIMplus testlerinin sırasıyla duyarlılıkları %100, %75,4, %84, %23; özgüllükleri ise %62,5, %48,8, %44, %100 olarak tespit edildi. mCIM ve aCIM testlerinin sonuçları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi. mCIM, aCIM ve eCIM testlerinin inhibisyon zon çapı eşik değeri 19 mm'den 22 mm'ye artırıldığında duyarlılığın artıp özgüllüğün düştüğü gözlemlendi.

Sonuç olarak fenotipik testler içerisinde hem performans hem de işlevsellik açısından en efektif sonuçların kombine disk metoduyla elde edileceğini, ancak çift direnç geni içeren izolatlar için ise fenotipik testlerin yetersiz olabileceğinin unutulmaması gerektiğini düşünüyoruz.

Anahtar kelimeler: Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*, karbapenemaz, kombine disk yöntemi, karbapenem inaktivasyon yöntemi

PROSPECTIVE EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF PHENOTYPIC TESTS USED IN DETECTION OF CARBAPENEMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE

SUMMARY

The Enterobacteriaceae family is the causative agent of both simple community-acquired infections and complex hospital-associated infections. Today, resistance to carbapenems, which is one of the last-choice treatments for Enterobacteriaceae, is becoming widespread due to increasing antimicrobial drug resistance. Surveillance networks have been established around the world due to the rapid spread of CRE isolates and the increase in morbidity and mortality due to infections. The data obtained here warns that BDE isolates spread horizontally between patients in health care institutions and now spreads in the society and threatens public health. For this reason, rapid and accurate detection of these isolates is important in preventing their spread by taking infection control measures. The most common cause of CRE's is the production of carbapenemases. The gold standard for the diagnosis of carbapenemases is molecular methods. However, it cannot be used widely due to experienced personnel, cost and well-equipped laboratory requirements. In our study, we aimed to evaluate the performance of phenotypic tests used in diagnosis.

100 *K.pneumoniae* isolate included to study that has been isolated from samples sent to our laboratory from various clinics of our hospital between 2018 and 2021. EUCAST 2021 criteria were used as carbapenemase screening criteria. Combined disk method, mCIM and aCIM tests were performed to detect the presence of carbapenemase on the isolates. The mCIM and aCIM tests were evaluated separately according to the 19 and 22 mm inhibition zone diameter cutoff threshold values. Combined disk method, eCIM and CIMplus methods were studied to detect the carbapenemase species and the results were compared. Resistance gene detection was performed on each of the isolates by real-time PCR.

The sensitivities of combined disc method, mCIM-19 mm, mCIM 22 mm, aCIM-19 mm, aCIM-22 mm tests as 100%, 83.8%, 94.8%, 82.7%, 94.6%, and the specificities as 83.3%, 100%, 34%, 100%, 57% respectively, for detection of carbapenemases. The sensitivities of combined disc method, eCIM-19 mm, eCIM-22 mm, CIMplus tests as 100%, 75.4%, 84%, 23%, and the specificities as 62.5%, 48.8%, 44%, 100% respectively, for detection of carbapenemase species. We could not detect a significant difference between the results of the mCIM and aCIM tests. We observed that when we increased the inhibition zone diameter threshold value of the mCIM, aCIM and eCIM tests from 19 mm to 22 mm, the sensitivity increased and the specificity decreased. We believe that the most effective results in terms of both performance and functionality will be achieved with the combined disk method. We think that phenotypic tests will be insufficient for isolates containing double resistance genes.

Key words: Carbapenem resistant Enterobacteriaceae, carbapenemase, combined disc method, carbapenem, inactivation method

KAYNAKLAR

1. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(3):1028-33.
2. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2008;29(12):1099-106.
3. Solgi H, Nematzadeh S, Giske CG, Badmasti F, Westerlund F, Lin Y-L, Goyal G, Nikbin VS, Nemati AH, Shahcheraghi F. Molecular epidemiology of OXA-48 and NDM-1 producing enterobacterales species at a University Hospital in Tehran, Iran, between 2015 and 2016. *Frontiers in microbiology*. 2020;11:936.
4. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, Kohlenberg A. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance*. 2019;24(9):1900123.
5. Organization WH. Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance: annual report 2020. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2020.
6. van den Hof S. Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance. Annual report. 2019;2019.
7. Control ECfDPa. < Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data>2022.
8. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2011;70(1):119-23.
9. Cam el ena F, Cointe A, Mathy V, Hobson C, Doit C, Bercot B, Decr e D, Podglajen I, Dortet L, Monjault A. Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by

use of a new carbapenem inactivation method-based test, CIMplus. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(9):e00137-18.

10. Tsai Y-M, Wang S, Chiu H-C, Kao C-Y, Wen L-L. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *BMC microbiology*. 2020;20(1):1-7.

11. Gelmez GA, Can B, Hasdemir U, Soyletir G. Evaluation of phenotypic tests for detection of carbapenemases: New modifications with new interpretation. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2021;27(2):226-31.

12. Petit M, Caméléna F, Cointe A, Poncin T, Merimèche M, Bonacorsi S, Birgy A, Berçot B. Rapid detection and characterization of carbapenemases in Enterobacterales with a new modified carbapenem inactivation method, mCIMplus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2020;58(11):e01370-20.

13. Wei Q, Sun J, Wang Z, Yan L, Zhang C, Xu X. Evaluation of modified rapid carbapenem inactivation method (mrCIM) combined with rapid EDTA-modified carbapenem inactivation method (reCIM) to detect carbapenemase and distinguish metallo-carbapenemase in Enterobacteriaceae within four hours. *Infection and Drug Resistance*. 2020;13:1919.

14. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, Li Y, Yu F, Jia M, Zhan Y. The simplified carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. *Frontiers in microbiology*. 2018;9:2391.

15. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical microbiology E-book*: Elsevier Health Sciences; 2020.

16. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM. *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*: Jones & Bartlett Publishers; 2020.

17. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(6):1211-33.

18. Chow JW, Shlaes DM. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1991;28(4):499-504.

19. Richmond M, Parker M, Jevons MP, JoHN M. High Penicillinase Production correlated with Multiple Antibiotic Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 1964:293-6.

20. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82.

21. Munoz-Price LS, Jacoby G, Snyderman D. Extended-spectrum beta-lactamases. *UpToDate online*. 2019.

22. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

23. Yamachika S, Sugihara C, Kamai Y, Yamashita M. Correlation between penicillin-binding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology*. 2013;62(3):429-36.
24. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*. 2012;18(5):263-72.
25. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *The Journal of infectious diseases*. 2017;215(suppl_1):S28-S36.
26. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(10):1791.
27. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clinical microbiology reviews*. 2005;18(2):306-25.
28. Abboud MI, Damblon C, Brem J, Smargiasso N, Mercuri P, Gilbert B, Rydzik AM, Claridge TD, Schofield CJ, Frère J-M. Interaction of avibactam with class B metallo- β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(10):5655-62.
29. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61.
30. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9(4):228-36.
31. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(2):818-20.
32. Borer A, Saidel-Odes L, Riesenberk K, Eskira S, Peled N, Nativ R, Schlaeffler F, Sherf M. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2009;30(10):972-6.
33. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(4):824-9.
34. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2007;20(3):440-58.
35. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):5046-54.
36. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S. Emergence of a new antibiotic resistance

mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*. 2010;10(9):597-602.

37. Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh TR. Does broad-spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(4):689-92.

38. Vatanserver C, Menekse S, Dogan O, Gucer LS, Ozer B, Ergonul O, Can F. Co-existence of OXA-48 and NDM-1 in colistin resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST235. *Emerging microbes & infections*. 2020;9(1):152-4.

39. Tsui CK, Sundararaju S, Al Mana H, Hasan MR, Tang P, Perez-Lopez A. Plasmid-mediated colistin resistance encoded by *mcr-1* gene in *Escherichia coli* co-carrying *bla*CTX-M-15 and *bla*NDM-1 genes in pediatric patients in Qatar 2020.

40. Scaife W, YOUNG H-K, PATON RH, AMYES SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1995;36(3):585-6.

41. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):15-22.

42. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2950-4.

43. Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg*. 2016;30(2):62-75.

44. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0. <http://www.eucast.org/>, 2021

45. CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

46. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible Enterobacteriaceae. *Gut pathogens*. 2014;6(1):1-7.

47. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis S, Daikos G, Casals JB, Tzouvelekis L. Combined disc methods for the detection of KPC-and/or VIM-positive *Klebsiella pneumoniae*: improving reliability for the double carbapenemase producers. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(9):E412-E5.

48. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PloS one*. 2015;10(3):e0123690.

49. CLSI. (2017). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27 th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

50. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, Bobenchik AM, Lockett ZC, Charnot-Katsikas A, Ferraro MJ. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*. 2017;55(8):2321-33.
51. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, Vourli S, Zerva L, Armaganidis A, Kanellakopoulou K. An outbreak of infection due to β -lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2–producing *K. pneumoniae* in a Greek university hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clinical infectious diseases*. 2010;50(3):364-73.
52. Stuart JC, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;36(3):205-10.
53. CDC Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from Rectal Swabs Center for Disease Control.
54. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Hey J, Zambardi G, Spiliopoulou I. Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemases-producing Enterobacteriaceae detection during rectal screening. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2014;33(1):35-40.
55. Garcia-Quintanilla M, Poirel L, Nordmann P. CHROMagar mSuperCARBA and RAPIDEC® Carba NP test for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2018;90(2):77-80.
56. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;75(2):214-7.
57. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(9):1503.
58. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(9):4578-80.
59. Mitra S, Kazi M, Panchal M, Rodrigues C, Shetty A. Evaluation of Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Indian journal of medical microbiology*. 2015;33(4).
60. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49(9):3222-7.
61. Papagiannitsis CC, Študentová V, Izdebski R, Oikonomou O, Pfeifer Y, Petinaki E, Hrabák J. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH_4HCO_3 , a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(5):1731-5.

62. Lasserre C, De Saint Martin L, Cuzon G, Bogaerts P, Lamar E, Glupczynski Y, Naas T, Tandé D. Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization– time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. *Journal of clinical microbiology*. 2015;53(7):2163-71.
63. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y, Bogaerts P, Ghiglione B, Power P, Mertens P. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *Journal of clinical microbiology*. 2016;54(11):2832-6.
64. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang T-D, Leclipteux T, Bogaerts P. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016;71(5):1217-22.
65. Findlay J, Hopkins KL, Meunier D, Woodford N. Evaluation of three commercial assays for rapid detection of genes encoding clinically relevant carbapenemases in cultured bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(5):1338-42.
66. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(4):906-9.
67. Ulyashova M, Rubtsova MY, Edelstein M, Alexandrova I, Egorov A. Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. *Acta Naturae (англоязычная версия)*. 2010;2(3 (6)).
68. Naas T, Cuzon G, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum β -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(4):1608-13.
69. Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide Kullanılan Moleküler Teknikler.
70. Martinez-Martinez L, Cantón Spain R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, Nordmann P, Wootton M, Miriagou V, Skov Simonsen G. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. *J Infect*. 2017;72:152-60.
71. Rodríguez-Baño J, Gutiérrez-Gutiérrez B, Machuca I, Pascual A. Treatment of infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-, AmpC-, and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical microbiology reviews*. 2018;31(2):e00079-17.
72. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(8):1664-71.
73. Us E, Kutlu HH, Tekeli A. Karbapenemaz üreticisi Enterobacteriaceae izolatlarının saptanmasında Modifiye Hodge Testi ile inhibitör tabanlı testlerin karşılaştırılması 2016.

74. Giske C, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical microbiology and infection*. 2011;17(4):552-6.
75. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Systematic comparison of three commercially available combination disc tests and zCIM for carbapenemase detection in Enterobacterales isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2021;JCM. 03140-20.
76. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2018;56(11):e01140-18.
77. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, Pfeifer Y, Chudackova E, Bergerova T, Gniadkowski M, Hrabak J. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia microbiologica*. 2015;60(2):119-29.

EKLER

EK-1: ETİK KURUL ONAYI



TEKİRDAĞ NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURULU KARAR FORMU



BAŞVURU BİLGİLERİ	Araştırmanın Açık Adı	Karbapenemaz Üreten Enterobacteriaceae Tespitinde Kullanılan Fenotipik Testlerin Etkinliklerinin Prospektif Olarak Değerlendirilmesi		
	Koordinatör / Sorumlu Araştırmacı	Prof. Dr. Nuri Kiraz / TNKÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji		
	Etik Kurul Toplantı Tarihi	27.04.2021		
	Araştırma Protokol Numarası	2021.122.04.17		
	Araştırmanın Türü	Prospektif <input checked="" type="checkbox"/>	Retrospektif <input type="checkbox"/>	Diğer: <input type="checkbox"/>
	Araştırmanın Destekleyicisi	TÜBİTAK <input type="checkbox"/>	TNKÜ BAP <input checked="" type="checkbox"/>	Araştırmacı <input type="checkbox"/> Diğer: <input type="checkbox"/>
	Araştırmanın Bütçesi	9500 ₺		
	Araştırmanın Merkezi	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	
KARAR BİLGİLERİ	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik bilimsel sakınca bulunmadığına, toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının oy birliği ile karar verilmiştir.			

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
----------------------------	--

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Araştırma ile İlişkili		Katılım *		İmza
Prof. Dr. Ali Rıza KIZILER	Biyofizik	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. M. Metin DONMA	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Savaş GÜZEL	Tıbbi Biyokimya	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Yakup ALBAYRAK	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Aysin NALBANTOĞLU	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Aliye ÇELİKKOL	Tıbbi Biyokimya	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Berna ERDAL	Tıbbi Mikrobiyoloji	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Birol TOPÇU	Biyoistatistik	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Ümit ÇETİN	Ortopedi ve Travmatoloji	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Naile Esra SAKA	Adli Tıp	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Sonat Pınar KARA	İç Hastalıkları	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Zeynep KURTULUŞ TOSUN	İç Hastalıkları Hemşireliği	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Mahluga JAFAROVA DEMİRKAPU	Tıbbi Farmakoloji	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ayhan ŞAHİN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

*: Toplantıda bulunma.

Etik Kurul Başkanının

Ünvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ali Rıza KIZILER

İmza: