İnvazif Enfeksiyonlara Neden Olan GSBL Pozitif *Enterobacteriaceae* İzolatlarında Karbapenem Direnci*

Carbapenem Resistance in ESBL Positive *Enterobacteriaceae* Isolates Causing Invasive Infections

Özgen KÖSEOĞLU ESER¹, Hatice ALTUN ULUDAĞ^{1,2}, Alper ERGİN³, Barış BORAL¹,
Burçin ŞENER¹, Gülşen HASÇELİK¹

¹ Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

² Turgut Özal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Turgut Özal University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

³ Hacettepe Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Tıbbi Laboratuvar Programı, Ankara.

³ Hacettepe University School of Health Services, Medical Laboratory Programme, Ankara, Turkey.

* Bu çalışma, 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi (KLİMUD) (12-16 Kasım 2011, Antalya)'nde
sözlü bildiriler olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 09.10.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 23.12.2013

ÖZET

Bu çalışmada 2005-2009 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde invazif enfeksiyonlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direnç varlığının fenotipik ve genotipik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya, BD Phoenix (Sparks, ABD) sistemiyle geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) pozitif olarak tespit edilen 153'ü *Escherichia coli*, 47'si *Klebsiella pneumoniae*, 10'u *Klebsiella oxytoca* olmak üzere toplam 210 kan izolatu dahil edilmiştir. İzolatların imipenem, meropenem ve ertapenem karşı duyarlılıkları, CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) önerilerine uygun şekilde mikrodilüsyon yöntemiyle, doripenem duyarlılığı ise E-test (bioMérieux, Hazelwood, ABD) yöntemiyle araştırılmıştır. Çalışmada karbapeneme dirençli olarak tespit edilen izolatlarda fenotipik doğrulama testleri uygulanmış ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle *bla*_{AmpC}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} antibiyotik direnç genlerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmamızda, GSBL üreten 210 *Enterobacteriaceae* kan izolatu'nun 23 (%11)'ünde karbapenem direnci saptanmış; imipenem, meropenem ve ertapenem direnci sırasıyla %5.7 (n= 12), %1.9 (n= 4) ve %2.4 (n= 5) olarak belirlenmiştir. İzolatlara karşı en etkin karbapenem grubu antibiyotiğin doripenem (direnç %1) olduğu gözlenmiştir. Yirmi üç izolatu yedisi sefotaksim/klavulanik asit (CTX/CLA) ve seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CLA) kombine disk difüzyon

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Özgen Köseoğlu Eser, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Ankara, Türkiye. Tel (Phone): +90 312 305 1560,
E-posta (E-mail): ozgen.eser@hacettepe.edu.tr

yöntemiyle GSBL negatif bulunurken, CTX/CLA diskinde boronik asit (BA) ilavesiyle yapılan modifiye kombine disk difüzyon yönteminde altı izolatın GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir. Modifiye Hodge testi (MHT) ve/veya ertapenem-BA kombine disk difüzyon testleriyle pozitif olarak saptanan üç izolatın birinde bla_{OXA-48} , diğerinde bla_{AmpC} geni saptanmıştır. Fenotipik olarak pAmpC varlığı tespit edilen üç *K.pneumoniae* izolatının birinde bla_{AmpC} geni gösterilmiştir. Bütün antibiyotikler için MİK değeri 256 µg/ml olan ve meropenem-BA, MHT, imipenem-EDTA, seftazidim-CAZ/CLA, sefoksitin-BA pozitif olan bir *K.pneumoniae* izolatında bla_{OXA-48} gen varlığı saptanmıştır. Beş izolatta bla_{OXA-1} ve bir izolatta bla_{OXA-10} gen varlığı gösterilmiştir. İki izolat bla_{CTX-M} pozitif olarak bulunmuş; izolatların hiçbirinde bla_{IMP} , bla_{VIM} ve bla_{NDM-1} genleri tespit edilmemiştir. Sonuç olarak, dört yıllık sürede izole edilen invazif *Enterobacteriaceae* türlerinin karbapenemlere olan direnç değerleri düşük düzeyde bulunmuştur. İzolatlardaki direnç, genellikle bla_{OXA} tipi karbapenemazlara bağlıdır ve bu izolatlarda bla_{KPC} ve bla_{NDM} varlığı saptanmamıştır.

Anahtar sözcükler: *Enterobacteriaceae*; GSBL; karbapenem direnci; karbapenemaz.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the presence of carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae* isolates recovered from invasive infections, in Hacettepe University Hospital, Ankara, Turkey, between 2005-2009, by phenotypic and genotypic methods. A total of 210 non-duplicated *Escherichia coli* (n= 153), *Klebsiella pneumoniae* (n= 47) and *Klebsiella oxytoca* (n= 10) isolates which were all determined to be extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) positive with the BD Phoenix automated identification and antibiotic susceptibility system (Sparks, USA), were included in the study. The isolates were recovered from patients with bloodstream infections. Susceptibility of the isolates to imipenem, meropenem and ertapenem was detected with microdilution method according to the standards of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) minimal inhibitory concentration (MIC) breakpoints. Doripenem susceptibility was detected by the E-test (bioMérieux, Hazelwood, USA). All isolates which were found to be non-susceptible to any of the carbapenem antibiotics tested, were characterized by the phenotypic confirmatory tests and the presence of the resistance genes; bla_{AmpC} , bla_{CTX-M} , bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{OXA} , bla_{IMP} ve bla_{VIM} were screened by polymerase chain reaction (PCR). Among the 210 ESBL-producing *Enterobacteriaceae* blood isolates, 23 (11%) were identified as non-susceptible to any of the carbapenems tested. Resistance rates for imipenem, meropenem and ertapenem were 5.7% (n= 12), 1.9% (n= 4) and 2.4% (n= 5), respectively. Doripenem was more active than the other carbapenems, with a resistance rate of 1.0%. Seven of 23 isolates were ESBL negative with cefotaxime/clavulanic acid (CTX/CLA) and ceftazidime/clavulanic acid (CAZ/CLA) combined disk diffusion test, however, six of them were ESBL positive with the addition of boronic acid (BA) to CTX/CLA. Among the three isolates positive for Modifiye Hodge test (MHT) and/or ertapenem-BA tests, bla_{OXA-48} was detected in one and bla_{AmpC} in the other. Phenotypic pAmpC activity was present in three *K.pneumoniae* isolates of which one was positive for bla_{AmpC} gene. One *K.pneumoniae* isolate resistant to all carbapenems with MICs > 256 µg/ml and positive for phenotypic meropenem-BA, MHT, imipenem-EDTA, ceftazidime-CAZ/CLA, ceftoxitin-BA production, was found to inhabit bla_{OXA-48} gene. Five isolates were positive for bla_{OXA-1} and one for bla_{OXA-10} . Two isolates were positive for bla_{CTX-M} , however bla_{IMP} , bla_{VIM} and bla_{NDM-1} genes were not detected among the isolates. In conclusion, carbapenem non-susceptibility which was low among the *Enterobacteriaceae* strains isolated in our center, was mostly attributed to the presence of bla_{OXA} type carbapenemases and no accumulation of bla_{KPC} and bla_{NDM} were detected.

Key words: *Enterobacteriaceae*; ESBL; carbapenem resistance; carbapenemase.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesinde yer alan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*, toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan bakterilerdir. Bu bakterilerde dirençten sorumlu en önemli mekanizma genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) yapımıdır. Karbapenemler, GSBL üreten, özellikle çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* türlerinde, son seçenek olarak kullanılan önemli bir antibiyotik grubudur. Karbapenemaz üreten izolatlar, ciddi enfeksiyonlara neden olarak hastanede yatış süresini uzatmakta ve mortalite oranlarını artırmaktadır. Dolayısıyla karbapenemlere karşı gelişen direncin izlenmesi önem taşımaktadır¹.

Karbapenem direnci çeşitli mekanizmalarla oluşmaktadır. Karbapenemleri hidroliz eden üç farklı sınıf beta-laktamaz bulunmaktadır. Bunlar Ambler sınıf A, sınıf B (metallo-beta-laktamazlar) ve sınıf D (oksasilinazlar) beta-laktamazlardır. Karbapenem direnci, bakteride plazmid aracılı AmpC (pAmpC) beta-laktamazlarla birlikte, porin mutasyonlarına bağlı dış membran geçirgenliğinin azalması sonucunda da ortaya çıkmaktadır².

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin tanısında, 2010 yılından önce "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" antibiyotik sınır değerlerine göre imipenem, meropenem ve ertapenem için ≥ 2 µg/ml minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerlerinin belirlenmesi durumunda, fenotipik ve/veya genotipik ileri testlerin yapılması önerilmiştir³. Bu açıdan modifiye Hodge testi (MHT), CLSI tarafından karbapenemaz doğrulama testi olarak önerilen tek fenotipik test olmuştur. 2010 yılı öncesi CLSI rehberlerine göre, karbapenem direnci açısından şüpheli *Enterobacteriaceae* izolatlarında MHT'nin pozitif bulunması halinde, yapılan mikrodilüsyon testi sonucunda ertapenem MİK değeri 2-4 µg/ml, imipenem 2-8 µg/ml ve meropenem 2-8 µg/ml bulunursa izolatların tüm karbapenemlere dirençli olarak rapor edilmesi önerilmiştir. Ancak CLSI'nın 2010 yılında mikrodilüsyon duyarlılık sınır değerlerinde yaptığı değişiklik sonucunda, imipenem, meropenem, doripenem için duyarlılık sınır değerleri ≤ 1 µg/ml, ertapenem için ise ≤ 0.5 µg/ml şeklinde belirlenmiştir. CLSI, yeni düşük sınır değerlerinin uygulanması durumunda, MHT'nin sadece enfeksiyon kontrol ve epidemiyolojik amaçlı yapılmasını ve karbapenem duyarlılık test sonuçlarının değiştirilmeden bildirilmesini önermiştir⁴.

MHT'nin tek başına karbapenemaz tanımlama testi olarak kullanımı doğru bir yaklaşım değildir. Bu nedenle, karbapenemazları tanımlamada kullanılacak etkin fenotipik testlere gereksinim vardır. MHT dışında, karbapenemazların saptanmasında halen çift disk sinerji ve kombine disk difüzyon testleri kullanılmaktadır. MBL üreten izolatların belirlenmesinde EDTA'nın indirgenmesi temeline dayanan fenotipik testlerin yanı sıra, boronik asit (BA)'ın kullanıldığı çift disk veya kombine disk difüzyon testleriyle KPC tipi beta-laktamazların tanımlanmasında kullanılan testler de bulunmaktadır⁵. Karbapenemazlara ait *bla* genlerinin genotipik olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gösterilmesi laboratuvar tanısında altın standarttır.

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının hızlı saptanması veya yayılımının engellenmesi açısından, karbapenem MİK değerlerinin düşürülmesi anlam ifade etse de, bu yaklaşım yanlış pozitif sonuçların artmasına yol açmaktadır. Bu enfeksiyonların hastane ortamındaki gerçek oranlarının belirlenmesi, uygun antibiyotik kullanımı ve enfeksiyon kontrolü açısından önem taşımaktadır. Bu çalışmada 2005-2009 yılları ara-

sında Hacettepe Üniversitesi Erişkin Hastanesinde invazif enfeksiyon tanısıyla takip edilen hastalardan izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direnç varlığının fenotipik ve genotipik olarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteriyel İzolatlar ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya, 2005-2009 yılları arasında BD Phoenix (BD, Sparks, ABD) otomatize bakteri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık sistemiyle GSBL pozitif olarak tespit edilen 210 izolat (153 *E.coli*, 47 *K.pneumoniae* ve 10 *K.oxytoca*) dahil edildi. İnvazif enfeksiyon tanısı alan hastaların kan kültürlerinden izole edilen tek bir suş çalışmaya alındı. İzolatlar konvansiyonel yöntemlerle doğrulandı. İzolatların imipenem, meropenem ve ertapenem antibiyotik duyarlılıkları, CLSI önerileri doğrultusunda mikrodilüsyon yöntemiyle, doripenem duyarlılığı ise E-test (bioMérieux, Hazelwood, ABD) yöntemiyle araştırıldı. Duyarlılık sonuçları CLSI, MİK sınır değerlerine göre belirlendi³. Tüm testlerde kontrol amacıyla *E.coli* ATCC 25922 standart suşu kullanıldı.

Karbapeneme dirençli izolat tespit edilen hastaların, yaş, cinsiyet, yoğun bakım ünitelerinde yatış durumu, altta yatan hastalıkları, verilen antibiyotik tedavisi ve son sağlık durumları hasta kayıt sisteminden elde edildi.

GSBL Tanısının Doğrulaması

CLSI tarafından önerilen sefotaksi-klavulanik asit (CTX-CLA) (Becton Dickinson, ABD) ve seftazidim-klavulanik asit (CAZ-CLA) (Becton Dickinson, ABD) kombine disk difüzyon doğrulama testinin yanı sıra, klavulanik asidin BA ile birlikte kullanıldığı modifiye kombine disk difüzyon yöntemi de kullanıldı^{4,5}.

Karbapenemazların Saptanması

Karbapeneme dirençli olarak tespit edilen izolatlara fenotipik doğrulama testleri uygulandı. Bu amaçla MHT, CLSI kriterlerine göre çalışıldı³. KPC tipi karbapenemazların tespiti için ayrıca, meropenem(MER)/ meropenem-BA (Becton Dickinson, ABD) ve ertapenem (ETP)/ETP-BA (Becton Dickinson, ABD) kombinasyon disk yöntemleri kullanıldı⁴. Metallo-beta-laktamaz tanımlanması için, CLSI kriterlerine uygun olarak imipenem (IMP)/IMP-EDTA (Becton Dickinson, ABD) kombine disk difüzyon yöntemi kullanıldı⁴. AmpC beta-laktamaz üretiminin tespiti için, sefoksitin (FOX) (Becton Dickinson, ABD)-BA (400 µg) kombine disk difüzyon testi uygulandı⁶.

Genotipik Testler

Karbapeneme dirençli olarak tespit edilen izolatlarda, dirençten sorumlu olabilecek gen varlığını göstermek amacıyla PCR yöntemi kullanıldı. İzolatların DNA'ları kaynatma yöntemiyle elde edildi. İzolatlarda *bla*_{KPC} gen varlığının araştırılması için F (5'-TGTCACGTATCGCCGTCTTAG-3') ve R (5'-TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC-3') primer dizileri¹; *bla*_{OXA} gen bölgeleri için multipleks PCR yönteminde kullanılan *bla*_{OXA-1}-F (5'-CAGATTCAACTTTCA AGATCG-3') ve R (5'-GTGTTTGAATGGTGATCG-3'); *bla*_{OXA-2}-F (5'-AAGAAACGCTACTCGCCTGC-3') ve R (5'-CCACTCAACCCATCC TACCC-3'), *bla*_{OXA-}

¹⁰-F (5'-GTCTTCGAGTACGGCATT-3') ve R (5'-ATTTCTTAGCGGCAACTTAC-3') primerleri⁷; *bla*_{OXA-48} gen bölgesi için F (5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3') ve R (5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3') primerleri¹ kullanıldı. MBL genleri için, *bla*_{IMP}-F (5'-CTACCGTTTTGCCTTACCAT-3') ve R (5'-AACCAGTTTTGCCTTACCAT-3'); *bla*_{VIM}-F (5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3') ve R (5'-ATGAAAGTGCTGGAGAC-3'); *bla*_{NDM-1}-F (5'-GGTTGGCGATCTGGTTTTC-3') ve R (5'-CGGAATGGCTCATCAGATC-3'); *bla*_{CTX-M}-F (5'-TCTCCAGAATAAGGAATCCC-3') ve R (5'-CCGTTCCGCTATTACAAAC-3') primerleri kullanıldı¹. pAmpC beta-laktamazların varlığının tespit edilmesi için *bla*_{AmpC} gen ailesinde yer alan altı gen (*bla*_{MOX}, *bla*_{CIT}, *bla*_{DHA}, *bla*_{ACC}, *bla*_{FOX} ve *bla*_{EBC}) multipleks PCR yöntemi ile araştırıldı⁸.

BULGULAR

Çalışmamızda, GSBL üreten 210 *Enterobacteriaceae* izolatının 23 (%11)'ünde karbapenem direnci saptanmıştır (Tablo I).

İmipenem MİK değerleri, meropenem, ertapenem ve doripenem MİK değerlerinden daha yüksek olarak saptanmıştır (Şekil 1, Tablo II). Yirmi üç izolatın hepsi imipeneme dirençli iken, 10'u ertapeneme, 9'u meropeneme ve 2'si doripeneme dirençli bulunmuştur. Karbapeneme dirençli 23 izolatın antibiyotiklere göre kümülatif MİK dağılımı Şekil 1'de gösterilmiştir. Buna göre doripenem, diğer karbapenemlerden daha etkili olarak gözlenmiştir. Ertapenem ve meropenem benzer etkinliğe sahipken, imipenem en düşük etkinliğe sahip karbapenem olarak belirlenmiştir.

Tablo I. GSBL Üreten İzolatların Karbapenem Duyarlılıkları (n= 210)

Antibiyotik	MİK Aralığı (µl/ml)	MİK ₅₀ (µl/ml)	MİK ₉₀ (µl/ml)	Direnç n (%)
İmipenem	0.25 - > 256	2	8	12 (5.7)
Meropenem	< 0.125 - > 256	0.125	1	4 (1.9)
Ertapenem	< 0.125 - > 256	< 0.125	0.25	5 (2.4)
Doripenem	0.008 - > 256	0.016	0.032	1 (0.5)

Şekil 1. Karbapeneme dirençli 23 izolatın kümülatif yüzdeleri (%).

Tablo II. Karbapeneme Dirençli 23 İzolatın Türlerine Göre MİK, Fenotipik ve Genotipik Test Sonuçları

No	Bakteri türü	IMP (µl/ml)	MER (µl/ml)	ETP (µl/ml)	DOR (µl/ml)	Fenotipik testler	Direnç genleri	Karbapenem tedavisi	Prognoz
1	<i>K.pneumoniae</i>	32	32	1	< 0.016	GSBL		MER	Takip
2	<i>K.pneumoniae</i>	16	< 0.125	< 0.125	< 0.023	GSBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	IMP	Takip
3	<i>K.pneumoniae</i>	8	< 0.125	< 0.125	< 0.032	GBL		-	Takip
4	<i>K.pneumoniae</i>	32	1	0.25	< 0.032	GSBL		MER	Ex
5	<i>K.pneumoniae</i>	16	4	2	< 0.064	AmpC; GSBL (BA)	<i>bla</i> _{OXA-1}	-	Ex*
6	<i>K.pneumoniae</i>	8	0.125	0.125	< 0.032	GSBL		IMP	Takip
7	<i>K.pneumoniae</i>	16	1	1	< 0.075	GSBL (BA)	<i>bla</i> _{OXA-1}	-	Ex
8	<i>K.pneumoniae</i>	8	1	8	< 0.023	GSBL		-	Takip
9	<i>K.pneumoniae</i>	128	128	128	< 0.038	MHT; GSBL		MER	Takip
10	<i>K.pneumoniae</i>	256	256	256	256	AmpC; MER-BA; MBL; MHT; GSBL	<i>bla</i> _{OXA-48}	IMP	Ex*
11	<i>K.pneumoniae</i>	16	8	64	< 0.032	GSBL	<i>bla</i> _{CTX-M}	-	Ex*
12	<i>K.pneumoniae</i>	4	8	64	< 0.023	AmpC; ETP-BA; GSBL	<i>bla</i> _{AmpC}	IMP	Takip
13	<i>K.pneumoniae</i>	16	4	0.5	< 0.032	GSBL (+BA)	<i>bla</i> _{OXA-10}	-	Takip
14	<i>K.oxyfoca</i>	8	0.25	0.25	< 0.032	GSBL (+BA)	<i>bla</i> _{OXA-1}	-	Takip
15	<i>K.oxyfoca</i>	8	< 0.125	0.25	< 0.047	GSBL (+BA)	<i>bla</i> _{OXA-1}	IMP	Takip
16	<i>K.oxyfoca</i>	8	0.25	0.25	< 0.023	GSBL (+BA)	<i>bla</i> _{OXA-1}	MER	Takip*
17	<i>E.coli</i>	8	< 0.125	0.5	< 0.032	GSBL		IMP	Takip
18	<i>E.coli</i>	8	< 0.125	< 0.125	< 0.023	GSBL		IMP	Takip
19	<i>E.coli</i>	8	4	4	< 0.064	GSBL	<i>bla</i> _{OXA-1}	-	Ex*
20	<i>E.coli</i>	8	< 0.125	< 0.125	< 0.016	GSBL		-	Takip
21	<i>E.coli</i>	16	0.25	< 0.125	< 0.016	GSBL		MER	Ex
22	<i>E.coli</i>	16	< 0.125	< 0.125	< 0.023	GSBL		-	Ex*
23	<i>E.coli</i>	16	16	128	2	GSBL		-	Ex*

* Yoğun bakım ünitesinde yatan hastalar.

BA: Boronik asit; DOR: Doripenem; ETP: Ertapenem; Ex: Eksitus; GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; IMP: İnipenem; MBL: Metallo-beta-laktamaz; MER: Meropenem.

Yirmi üç izolatin 7'si CTX/CLA ve CAZ/CLA yöntemiyle GSBL negatif olarak bulunurken, CTX/CLA diskine BA eklenmesiyle bu izolatların 6'sının GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir. MHT ve/veya ETP-BA kombine disk difüzyon testleriyle pozitif olarak saptanan 3 izolatin birinde *bla*_{OXA-48} diğerinde *bla*_{AmpC} geni saptanmıştır (Tablo II).

Fenotipik olarak AmpC varlığı tespit edilen 3 *K.pneumoniae* izolatinın birinde *bla*-AmpC geni gösterilmiştir. Bu izolatların ikisinde aynı zamanda fenotipik olarak karbapenemaz varlığı tespit edilmiştir. Bütün antibiyotikler için MİK değeri 256 µg/ml olan ve MER-BA, MHT, IMP-EDTA, CAZ-CAZ/CLA, FOX-BA pozitif olan bir *K.pneumoniae* izolatında *bla*_{OXA-48} gen varlığı bulunmuştur. Beş izolatta *bla*_{OXA-1} ve bir izolatta *bla*_{OXA-10} gen varlığı gösterilmiştir (Tablo II). İki izolatta ise *bla*_{CTX-M} pozitif olarak bulunmuştur. İzolatların hiçbirinde *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{NDM-1} genleri tespit edilmemiştir.

Karbapeneme dirençli suşların izole edildiği 23 hastanın özellikleri Tablo III'te görülmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde yatan hasta sayısı 7 olarak belirlenmiş, bütün hastalarda altta yatan hastalıkların olduğu saptanmıştır. Hastaların 12'sine enfeksiyon tedavileri sırasında imipenem veya meropenem verilmiştir.

TARTIŞMA

2000'li yıllardan itibaren karbapenemler dışında tüm sefalosporinlere dirençli kabul edilen GSBL üreten *E.coli* izolatlarının dünyada yaygınlaşması sonucu hayatı tehdit eden nozokomiyal enfeksiyonlarının tedavisinde son seçenek ilaç olarak karbapenemlerin korunması gerekliliği öne çıkmıştır. Gelecekte dünyada karbapenem üreten mikroorganizmalar ile iki büyük epidemi beklenmekte; bunlardan birinin toplum kaynaklı *E.coli* suşları, diğerinin ise hastane kaynaklı *K.pneumoniae* suşları ile gerçekleşmesi öngörülmektedir¹. Bu nedenle, karbapenem üreten mikroorganizmaların erken tanımlanması hastane salgınlığının önlenmesi açısından zorunludur.

Tablo III. Karbapeneme Dirençli Suşların İzole Edildiği Hastaların Özellikleri (n= 23)

Yaş ortalaması (Yaş aralığı) (Yıl)	50 (0-75)
Kadın/Erkek (n)	13/10
Yoğun bakım/Servis (n)	7/16
IMP & MER tedavisi alan hasta sayısı	12
Altta yatan hastalık varlığı (n)	
Kanser*	13
Diğer**	10
Prognoz	
Takip	14
Ölüm	9

* Lenfoma, pankreas, prostat, over, mide, böbrek hücre, sarkoma, Hodgkin.

** Kronik hepatit/karaciğer, talamik kanama, tüberküloz menenjit, Hashimoto tiroidi, Guillain Barre, polihidroamniyozis, kanamalı üremik sendrom.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde 2007-2009 yılları arasında SENTRY çalışması kapsamında 42 merkezden toplanan hastane enfeksiyonu etkeni 2049 *K.pneumoniae* izolatında karbapenem direnci %6.1 olarak tespit edilmiştir⁹. COMPACT çalışması kapsamında Türkiye'den dahil edilen 10 merkezden 2008 yılı içinde toplanan 240 *Enterobacteriaceae* izolatında doripenem, imipenem ve meropenem direnç oranları %1.3 olarak saptanırken, doripenem ve meropenem 0.12 µg/ml $MİK_{90}$ değeri ile imipenemden ($MİK_{90}$ = 0.5 µg/ml) dört kat daha aktif bulunmuştur¹⁰. Çalışmamızda *Enterobacteriaceae* türlerinde imipenem, meropenem ve ertapeneme düşük düzeyde direnç (sırasıyla; %5.7, %1.9 ve %2.4) saptanmıştır. Doripenem ise en etkili karbapenem olarak belirlenmiştir. Doripenemin, *Enterobacteriaceae* türlerinde daha duyarlı olduğu diğer bazı çalışmalarla da desteklenmiştir^{11,12}. COMPACT çalışmasının Almanya'da yedi merkezden toplanan 167 *Enterobacteriaceae* izolatında $MİK_{90}$ değerleri, doripenem, meropenem ve imipenem için sırasıyla 0.06, 0.06 ve 0.5 µg/ml olarak belirlenirken, Asya-Pasifik bölgesine ait beş ülkede COMPACT çalışmasına dahil olan 20 merkezden toplanan 500 *Enterobacteriaceae* izolatında $MİK_{90}$ sonuçları sırasıyla 0.09, 0.09 ve 0.5 µg/ml olarak tespit edilmiştir^{11,12}.

Enterobacteriaceae izolatlarında bulunan pAmpC türü beta-laktamazların GSBL'leri maskeleyerek saptanmalarını önledikleri çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir¹³. Baykal ve arkadaşlarının¹⁴ yaptıkları bir çalışmada, 99 *E.coli* ve 114 *K.pneumoniae* izolatının 10'unda pAmpC pozitifliği GSBL ile birlikte tespit edilmiş ve bir izolatta GSBL fenotipinin maskeleyen olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda, otomatize yöntemle GSBL pozitif sonuç veren izolatlar içinde karbapenem direnci belirlenen 23 izolatın sadece 17'sinde CTX-CLA ve CAZ-CLA kombine disk difüzyon doğrulama testleriyle GSBL pozitif bulunmuş, ancak BA ilavesiyle geriye kalan altı izolatta da GSBL üretimi doğrulanmıştır. pAmpC varlığı FOX-BA kombine disk difüzyon yöntemiyle araştırılmış ve üç izolatta fenotipik olarak pAmpC varlığı gözlenirken, bunların birinde *bla*_{AmpC} geni tespit edilmiştir. Karbapenem direncinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarında belirlenmesi önemlidir. 2010 yılında değişen CLSI sınır değerleri, düşük karbapenem $MİK$ değerlerine sahip karbapenemaz üreten izolatların gözden kaçmasına neden olabildiği gibi, bu izolatların karbapenemaz pozitif olarak değerlendirilip karbapenem tedavisinden gereksiz yere kaçınılmasına da yol açabilmektedir. Karbapenemazları belirlemede kullanılan MHT'nin yüksek duyarlılığına rağmen, bu test özellikle GSBL veya azalmış porinler ile birlikte pAmpC varlığı halinde yanlış pozitif sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında doğrulama testlerinin uygulanmasının önemi büyüktür¹⁵. Düşük özgüllüğe sahip olması nedeniyle MHT'ni yorumlarken olası yanlış pozitif sonuçları göz önünde bulundurmak gerekmektedir¹⁶. Çalışmamızda karbapenemaz geni pozitif yedi izolattan sadece birinde MHT pozitif sonuç vermiştir. MHT'nin yanlış pozitif ve/veya negatif sonuç vermesi, izolatlardaki diğer *bla*_{GSBL} veya *bla*_{AmpC} gen varlıklarına bağlanmaktadır. Bu açıdan değerlendirme yapıldığında, *bla*_{AmpC} gen pozitifliği bir izolatta, fenotipik pAmpC varlığı üç izolatta tespit edilmiştir. İzolatların hepsinin GSBL pozitif oldukları göz önüne alındığında, karbapenemaz varlığı gösterilemeyen izolatlarda, başka antibiyotik direnç mekanizmalarının olduğu düşünülmelidir. Buna benzer nedenlerle, laboratuvarlarda karbapenemazların tanısında tercih edilen fenotipik testlerin, doğru tanıya götürecek yeni modifikasyonlarının takip edilerek kullanılması önem taşımaktadır.

Enterobacteriaceae türlerinde görülen karbapenem direncinden en sık sorumlu mekanizma, karbapenemaz enzimlerinin üretimi olmakla birlikte, eş zamanlı gelişen porin kaybı veya atım pompası aktivitesindeki artış da direncin ortaya çıkışını kolaylaştırmaktadır¹⁷. Yapılan çalışmalarda, özellikle *bla*_{KPC} pozitif olan *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnci, porin mutasyonlarına bağlı olarak gelişebilmektedir. Kültür pasajları ve izolatların stoklanması sırasında gelişen gen kayıpları, dirençli izolatların stoklanma sonrasında duyarlı hale geçebildiğini göstermiştir¹⁷. Direnç belirlenen izolatlar içerisinde yedi izolatta karbapenemaz gen varlığı gösterilse de, izolatlardaki karbapenem direnci çok farklı nedenlere bağlı olabilmektedir. Bu direncin GSBL veya AmpC tipi enzimlerle birlikte bakteride bulunan porin kaybı veya artmış atım pompa aktivitesi nedeniyle de gelişebileceği düşünülmelidir^{15,18,19}. Ayrıca, yüksek MİK değerlerinin sebebi, bu çalışmada araştırılmayan diğer direnç genlerinin varlığıyla da açıklanabilir.

K.pneumoniae'de *bla*_{OXA-48} varlığı ilk defa 2001 yılında Türkiye'deki bir izolatta bildirilmiştir²⁰. OXA-48 üreten *K.pneumoniae* izolatları Türkiye'yi takiben Orta Doğu, Kuzey Afrika, Avrupa ve Amerika'dan da bildirilmiştir²¹. Son birkaç yıl içinde Avrupa'da karbapenemaz üreten izolatlarla ilgili enfeksiyonlardaki artış, özellikle OXA-48'in toplum kaynaklı yayılımına bağlanmaktadır²². Çalışmamızda, *K.pneumoniae* izolatlarından birinde *bla*_{OXA-48} gen varlığı saptanmış olup, bu izolat bütün karbapenemler için çok yüksek düzey direnci gösteren MİK değerine (256 mg/L) sahiptir. Kullanılan birçok fenotipik test bu izolat açısından pozitif sonuç vermiştir (Tablo II). İzolat yoğun bakım ünitesinde yatan akut miyelositer lösemili bir hastadan elde edilmiş ve hasta tedavisi sırasında imipenem de dahil olmak üzere birçok beta-laktam kullanmasına rağmen hayatını kaybetmiştir.

Yapılan çalışmalar, *E.coli* ve *K.pneumoniae*'ya bağlı septisemi olgularında karbapenemaz varlığının, hastanın morbidite ve mortalitesini artıran sonuçlara neden olduğunu ve bu tip izolatlarda GSBL ve karbapenemazların birlikte bulunmasının, hasta ölüm oranlarını daha da yükselttiğini göstermektedir²³. Karbapenem direnci belirlenen izolatların elde edildiği hastalar hakkındaki bilgilerimiz kısıtlı olmakla birlikte, izolatların hepsinin kan örneği olması, hasta yaş ortalamasının yüksek olması, hastaların tümünde altta yatan hastalıkların bulunması ve yarıdan fazlasının tedavileri sırasında imipenem ve/veya meropenem alma öyküsünün bulunması, karbapenemaz varlığı açısından izolatların değerlendirilmesi gereğini ortaya koymuştur. Karbapenemaz gen varlığı gösterilen yedi izolat, aynı zamanda GSBL pozitif olarak belirlenirken, hastalarda ölüm oranı %39 (9/23) olarak izlenmiştir. Dolayısıyla karbapenemazların tanı ve takibinin, tedavi ve prognoz açısından önemi bu çalışmayla da desteklenmiştir.

Sonuç olarak, 2005-2009 yılları arasında hastanemizde invazif enfeksiyonlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenem direnç değerlerinin düşük olduğu ve direncin sıklıkla *bla*_{OXA} tipi karbapenemazlara bağlı olduğu görülmüştür. İzolatlarda *bla*_{KPC} ve *bla*_{NDM} varlığı saptanmamıştır. Karbapenem direncinin yorumlanmasında uygulanmaya başlanan yeni CLSI MİK sınır değerleri, rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında, karbapenemaz üretimine bakmaksızın, karbapenem direnci bildirilmesine neden olmaktadır. Ancak, birçok *Enterobacteriaceae* izolatında karbapenemaz aktivitesi gös-

teren enzimler olmadığı halde, karbapenem MİK değerleri yüksek bulunabilmektedir. Bu durum, birçok antibiyotik grubunun tedavide kullanılabilirliğini kısıtlamaktadır²⁴. Bu nedenle, hastane ortamında enfeksiyon kontrol politikalarının doğru uygulanabilmesi için, karbapenemazları saptayan güvenilir ve basit testlere gereksinim vardır. Bu araştırma, hastanemizde henüz tehdit edici boyuta varmamış olan düşük karbapenem direncini saptaması ve bu dirence sahip izolatlarda direnç mekanizmalarını analiz etmesi nedeniyle, daha sonra yapılacak çok merkezli araştırmalara ışık tutacaktır.

TEŞEKKÜR

Pozitif kontrol suşları için Prof. Dr. Murat Akova (Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi), Prof. Dr. Rıza Durmaz (Türkiye Halk Sağlığı Kurumu) ve Dr. Thierry Nass (Paris-Sud Üniversitesi Tıp Fakültesi)'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17(10): 1791-8.
2. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, et al. Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16(2): 112-22.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement. CLSI Document M100-S19, 2009. CLSI, Wayne, PA.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 22nd Informational Supplement. CLSI Document M100-S22, 2012. CLSI, Wayne, PA.
5. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(8): 1664-71.
6. Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH. Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 2007; 45(4): 1180-4.
7. Costa D, Poeta P, Saenz Y, et al. Prevalence of antimicrobial resistance and resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates recovered from healthy pets. *Vet Microbiol* 2008; 127(1-2): 97-105.
8. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6): 2153-62.
9. Kaiser DM, Castanheira M, Jones RN, Tenover F, Lynfield R. Trends in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-positive *K. pneumoniae* in US hospitals: report from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3): 356-60.
10. Leblebicioğlu H, Kakir N, Celen M, Kurt H, Baris H, Laeuffer J; Turkish COMPACT Study Group. Comparative activity of carbapenem testing (the COMPACT study) in Turkey. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 42.
11. Valenza G, Seifert H, Decker-Burgard S, Laeuffer J, Morrissey I, Mutters R. Comparative activity of carbapenem testing (COMPACT) study in Germany. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(3): 255-8.
12. Kiratisin P, Chongthaleong A, Tan TY, et al. Comparative in vitro activity of carbapenems against major gram-negative pathogens: results of Asia-Pacific surveillance from the COMPACT II study. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(4): 311-6.
13. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22(1): 161-82.
14. Baykal A, Çöplü N, Şimşek H, Esen B, Gür D. Kan izolatu *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarında genişlemiş-spektrumlu beta-laktamaz, KPC-tip karbapenemaz ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2012; 46(2): 159-69.

15. Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamase in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2012; 50(4): 1295-302.
16. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol 2012; 50(2): 477-9.
17. Gomez E, Urban C, Mariano N, et al. Phenotypic and genotypic screening and clonal analysis of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* at a single hospital. Microb Drug Resist 2011; 17(2): 251-7.
18. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. J Antimicrob Chemother 2009; 63(4): 659-67.
19. Baroud M, Dandache I, Araj GF, et al. Underlying mechanisms of carbapenem resistance in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates at a tertiary care centre in Lebanon: role of OXA-48 and NDM-1 carbapenemases. Int J Antimicrob Agents 2013; 41(1): 75-9.
20. Poirel L, Heritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 15-22.
21. Patel A, Bonomo RA. Stormy waters ahead: global emergence of carbapenemases. Front Microbiol 2013; 4: 48.
22. Canton R, Akova M, Carmelli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 413-31.
23. Gupta V, Bansal N, Singla N, Chander J. Occurrence and phenotypic detection of class A carbapenemases among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates at a tertiary care center. J Microbiol Immunol Infect 2013; 46(2): 104-8.
24. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. Clin Microbiol Rev 2012; 25(4): 682-707.