ANKEM Derg 2016;30(2):62-75
doi: 10.5222/ankem.2016.062

Derleme

KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ENTEROBACTERIACEAE* İZOLATLARININ SAPTANMASINDA FENOTİPİK VE GENOTİPİK METOTLAR

Ümit KILIÇ[1], Tayfur DEMİRAY[2], Mustafa ALTINDİŞ[1]

[1]Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, SAKARYA
[2]Sağlık Bakanlığı, Sakarya Üniversitesi, Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, SAKARYA

ÖZET

Başta karbapenem direnci olmak üzere çoklu ilaç direnci hem hastane hem de toplum kaynaklı salgınlara neden olmakta, dirençli bakteri türlerinin çeşitliliğini artırmakta ve tüm dünyada alarm düzeyinde hızla yayılmaktadır. İnfekte hastalar ve kolonize taşıyıcıların erken ve etkin şekilde saptanması, çoklu ilaç direncininin yayılmasının önlenmesi ve infeksiyon kontrolünde zorunlu adımdır. Güncel EUCAST rehberi karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae'nın belirlenmesinde, direncin maksimum duyarlılıkta saptanmasını garantilemek için pozitif örneklerde düşük klinik sınır değerlerinin kullanılmasını önermektedir. Günlük iş akışı içinde direnç paterni ve türünü saptamak için öncelikle bir tarama yöntemi gereklidir, ardından bunu fenotipik ve/veya genotipik olarak bir doğrulama testi takip edebilir.

Burada kullanılabilecek fenotipik testler; Modifiye Hodge Testi (MHT), inhibitör bazlı yöntemler (çift disk sinerji testi, kombine disk testleri, E test-MBL vb.), kromojenik besiyerleri, biyokimyasal yöntemler (Carba NP, Blue carba), MALDI-TOF MS ve immünokromotojenik yöntemler iken başlıca genotipik metotlar ise PZR çeşitleri, oligonükleotid hibridizasyonu, PFGE ve MLST şeklindedir. Karmaşık direnç paternli patojenleri saptamak ve yayılımı kontrol etmek için hem optimize fenotipik testler hem de genotipik analizler klinik laboratuvarlarının rutin tanısal testleri olarak önerilmektedir.

Anahtar sözcükler: *fenotipik testler, genotipik metotlar, karbapenemazlar, karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae*

SUMMARY

Phenotypic and Genotypic Methods for Determination of Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* Isolates

Multidrug resistance, particularly, carbapenem resistance is spreading worldwide at an alarming rate, comprehending a variety of bacterial species and causing both nosocomial and community acquired outbreaks. Early and efficient detection of infected patients or colonized carriers is the mandatory step in infection control and prevention of multidrug resistance spread. The latest EUCAST guidelines for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae have proposed using low clinical breakpoints to ensure the maximum detection sensitivity of positive samples. Current workflows involve an initial screening step for species and resistance pattern detection, followed by phenotypic and/or genotypic confirmation.

Phenotypic tests for determination of the carbapenemase-producing Enterobacteriaceae were Modified Hodge Test (MHT), inhibitor-based methods (double-disk synergy test, combined disk test, E Test-MBL), chromogenic culture media, biochemical methods (Carba NP, Blue carba etc.), MALDI-TOF MS, immunochromotogenic methods; the genotypic methods were PCR, oligonucleotide hybridization, PFGE ve MLST. To detect and to control the spread of pathogens with complicated resistance patterns, both optimized phenotypic analysis and genotypic assays are recommended in the routine diagnostic of clinical laboratories.

Keywords: *carbapenemases, carbapenemase producing Enterobacteriaceae, genotypic methods, phenotypic tests*

İletişim adresi: Mustafa Altındiş. Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Korucuk Kampüsü, SAKARYA
GSM: (0532) 661 52 63
e-posta: maltindis@gmail.com
Alındığı tarih: 13.02.2016, Yayına kabul: 04.05.2016

GİRİŞ

Enterobacteriaceae, insan ve hayvanların intestinal florasında bulunan heterojen bir bakteri ailesidir ve klinik örneklerden patojen olarak sıkça izole edilmektedir. Toplum kaynaklı basit infeksiyonlardan tıbbi bakımla ilişkili komplike, tedavisi zor infeksiyonlara kadar geniş bir klinik tablo oluşturabilirler.

Özellikle tıbbi bakımla ilişkili infeksiyonlarda artan antimikrobiyal ilaç direnci, morbidite ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır ve global yayılımla büyük bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir[42,56]. Son yıllarda sıklığı artan toplum kaynaklı ve tıbbi bakımla ilişkili (cerrahi işlemler, cihaz kullanımı, yoğun bakımda uzun süre kalma, immün supresyon) genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten suşlar, karbapenem dışındaki sefalosporinler de dahil olmak üzere beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilmektedir. Hayatı tehdit eden bu infeksiyonların tedavisinde mecburen ve nihai olarak başvurulan antibiyotikler karbapenemler olmaktadır (imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem). Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşları ise karbapenemlerin etkilerinin zayıf olduğu, mortalitesi yüksek, yoğun ve çeşitli kombine antibiyoterapiyle tedavi edilmeye çalışılan infeksiyonlara neden olmaktadırlar[16,41]. Çeşitli salgınlar ve küresel sporadik vakalarla karbapenem dirençli suşların yayılımı, direnç mekanizmalarının araştırılması ve dirençli suşlarla kolonize hastaların izolasyonu gibi çalışmaları beraberinde getirmiştir[1,42]. Direnç mekanizmalarının araştırılması, antibiyotik duyarlılık raporu için gerekli görülmese de halk sağlığı ve infeksiyonların kontrolü açısından önem kazanmıştır.

Direnç mekanizmaları (Karbapenemazlar)

Enterobacteriaceae spp. suşlarında karbapenem direnci çoğunlukla karbapenamaz özelliği olan beta-laktamaz üretimi ile gelişmektedir. Karbapenemazlar, karbapenemlerin hidrolizine ve bunun sonucunda karbapenem minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinde yükselmeye neden olan beta-laktamazlardır. Karbapenem direncinde, karbapenemazlara göre daha kısıtlı olan diğer mekanizmalar, efluks, impermeabilite ve buna eşlik eden AmpC veya GSBL üretimidir[42]. Karbapenem direncinin başlıca sorumlusu olan karbapenemazların fonksiyonel ve yapısal olarak çeşitli sınıflandırmaları olsa da sıklıkla kullanılan sınıflama moleküler Ambler sınıflamasıdır. Karbapenemazlar, Ambler sınıflamasında A, B ve D sınıfı beta-laktamazları içeren geniş bir gruptur[52]. A ve D sınıfı beta-laktamazlar aktif bölgesinde serin içerirken B sınıfı beta-laktamazlar aktif bölgesinde çinko (Zn) içerir ve metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak adlandırılırlar (Tablo 1).

Tablo 1. *Karbapenemazların sınıflaması ve başlıca özelliklerin karşılaştırılması.*

Ambler sınıflaması	Sınıf A	Sınıf B	Sınıf D
Epidemiyolojik bölge	ABD, İngiltere	Japonya,Hindistan	Türkiye, Ortadoğu
Plazmid kaynaklı	KPC,GES	NDM	--
Kromozal	NmcA, SME	VIM-2,IMP-1, IMP-2	OXA-23, OXA-48, OXA-181
Enzim aktif bölgesi	Serin	Zn	Serin
Genel inhibitörleri	Boronik asit. Klavulanat ile zayıf inhibisyon	Dipikolinik asit, EDTA	-
Beta-laktamlar üzerine etkileri	Monobaktamlar da dahil tüm beta-laktamlara (sefamisinler hariç) etkili. GES, monobaktamlara etkili değil ve karbapenemler üzerinde etkisi zayıf	Aztreonam dışında tüm beta-laktamlara etkili.	Karbapenemler üzerinde zayıf hidrolitik aktivite. Aztreonama etkili değil. Oksasilin ve kloksasilin üzerinde etkili.
Modifiye Hodge Testi	Pozitif	Değişken	Pozitif

Sınıf A karbapenemazlar

Beta-laktamlar üzerinde geniş hidrolitik aktiviteye sahip olan sınıf A karbapenemazlar, serin karbapenemazlar grubuna aittirler vekarbapenemlere ek olarak aztreonamı, penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize edebilirler. Klavulanik asit ve tazobaktam ile kısmen inhibe olabilirler[42]. Bu sınıfta plazmidle kodlanan KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ve kromozomal kodlanan NMC/IMI (not metalloenzyme carbapenemase/Imipenem hydrolyzing β-lactamase) ile SME (*Serratia marcescens* enzyme) olmak üzere üç majör enzim grubu tanımlanmıştır[2,68]. KPC üreten suşlar, bu grubun çoğunluğunu oluşturmaktadırlar[42]. KPC (KPC-2) ilk olarak 1996'da Amerika'da (North Carolina) bir *K.pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir[68]. Takip eden yıllarda küçük salgınlar ve sporadik vakalarla New York ve ülke genelinde yayılım gözlenmiştir[5,28]. Amerika'dan sonra İsrail' de (Tel Aviv) ve Avrupa'da (İtalya ve Yunanistan) KPC üreten suşların neden olduğu hastane salgınları bildirilmiştir[32,54]. Güney Amerika ve Çin'de rapor edilen olgularla KPC global bir problem haline gelmiştir[39]. Klonal analizlerde dünya genelinde sık rastlanan ST258 sekans tipi olmakla beraber global yayılımla ilişkilendirilen riskli klonlar bildirilmiştir[67].

Sınıf B karbapenemazlar: Metallo-beta-laktamazlar

MBL olarak bilinen bu grup, beta-laktam halkasındaki amid bağlarını serin beta-laktamazdan farklı bir mekanizma ile hidrolize eder. Enzimin sabit aktif bölgesinde aktivitesini düzenleyen çinko (Zn++) iyonları vardır[66]. Bu nedenle metal şelatör olan etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile inhibe olur. Aktif bölgesinin esnek olukları, geniş spektrumlu bir beta-laktamaz aktivitesi sağlar. Buna rağmen MBL enzimlerinin hidrolize edemediği aztreonam, teröpatik olarak kullanılma potansiyeli göstermektedir[66]. Metal iyon bağımlı beta-laktamazlar 1960'lı yıllardan beri bilinen ve çalışılan bir grup olmakla beraber yakın zamana kadar *Bacillus cereus, Stenotrophomonas maltophilia, Aeromonas* spp. ve *Chryseobacterium* spp. gibi infeksiyon etkeni olarak sık karşılaşılmayan bakterilerde gösterilmiştir[30,53]. *Enterobacteriaceae* ailesinde nadiren görülürken MBL üreten *Pseudomonas* suşlarıyla salgınlar bildirilmiştir[31]. Maalesef günümüzde MBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarıyla bildirilen epidemik ve sporadik vakalar ciddi bir sağlık problemi haline gelmiştir. *Enterobacteriaceae* suşlarında yaygın görülen MBL'ler, Verona integron-encoded MBL (VIM), Imipenemase (IMP) ve New Delhi MBL-1 (NDM-1) tip enzimlerdir[52]. IMP ve VIM Yunanistan, Japonya ve Tayvan'da endemik olarak rapor edilmektedir. Yine birçok ülkede salgın ve sporadik vakalar bildirilmektedir[52]. NDM-1 enzimi ilk olarak 2007 yılında İsveç'te, Hindistan'a sıkça seyahatlerde bulunan bir hastada rapor edilmiştir. NDM-1 olarak adlandırılan bu direnç geninin orjininin Hindistan olduğu belirtilmiştir.Vakaların çoğu Hindistan orjinli olmak üzere Pakistan, Birleşik Krallık, İtalya ve Umman'da çok sayıda suş rapor edilmiştir[4,29]. IMP tipi karbapenemazlar sporodik olarak ülkemizden rapor edilmektedir. Ancak durum NDM-1 tipi karbapenemazlar için daha dikkat çekicidir. Türkiye NDM-1 için bölgesel yayılımın rapor edildiği bir ülke olarak Düzey 3 endimisitede bir ülke olarak tanımlanmıştır (Tablo 2). Ancak NDM-1 için bu endemisite düzeyinin önümüzdeki dönemlerde daha da artacağı öngörülebilir. Enzimlerin yapısındaki aminoasitlerin dizilimindeki farklılıklar, bu enzimlerin varyantlarını oluşturmaktadır[52]. Çeşitli integron yapılarında lokalize olan bu genler, plazmid ya da transpozonla ilişkili olduğunda bakteriler arasında transferi kolaylaşmaktadır[52]. Yapılan çalışmalarda halen birçok yeni MBL varyantı tespit edilmektedir. MBL'lerin global dağılımını inceleyen çok merkezli bir çalışmada, VIM (VIM-2, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45), IMP (IMP-48, IMP-49), NDM-16 gibi güncel varyantlar bildirilmiştir[26]. Bu grupta bulunan diğer metalloenzimler arasında German Imipenemase (GIM), Seoul Imipenemase (SIM) ve Sao Paulo MBL (SPM) bulunmaktadır[52].

Sınıf D karbapenemazlar: Oksasilinazlar

Bir diğer serin beta-laktamaz olan oksasilinazlar, fonksiyonel olarak oksasilin ve kloksasilini hidrolize edebilen penisilinazlar olarak tanımlanmaktadır. Bu enzim grubunda karbapenemaz aktivitesi ilk olarak 1993 yılında *Acinetobacter baumannii* suşunda tanımlan-

Tablo 2. *Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae, Avrupa ülkelerinde karbapenemaz tiplerine göre epidemiyolojik durum: 2014-2015 [(1)].*

Ülkeler	KPC	OXA-48	VIM	NDM	IMP
Almanya	2	3	1	2	1
Arnavutluk	1	0	0	0	0
Avusturya	2	1	2	1	0
Belçika	4	4	3	3	0
Birleşik Krallık	4	2	2	2	0
Bosna-Hersek	0	0	0	0	0
Bulgaristan	2	1	1	2	0
Çek Cumhuriyeti	2	1	2	1	0
Danimarka	1	1	0	4	0
Estonya	0	1	0	1	0
Finlandiya	2	1	1	1	1
Fransa	2	4	2	3	1
Hırvatistan	2	3	2	2	1
Hollanda	2	2	2	1	1
İrlanda	3	3	1	2	1
İspanya	3	4	4	2	1
İsrail	4	2	1	2	0
İsveç	1	2	1	1	1
İtalya	5	3	4	1	0
İzlanda	0	0	0	0	0
Karadağ	0	0	0	1	0
Kıbrıs	1	1	0	0	0
Kosova	0	0	0	0	0
Letonya	0	0	1	0	0
Litvanya	0	1	0	1	0
Macaristan	1	2	4	1	0
Makedonya	1	0	0	0	Bilinmiyor
Norveç	1	1	1	1	1
Polonya	3	1	2	4	Bilinmiyor
Portekiz	2	1	1	2	0
Romanya	4	4	2	4	Bilinmiyor
Sırbistan	1	2	0	2	0
Slovakya	4	0	1	1	0
Slovenya	1	2	1	2	0
Türkiye	0	5	2	3	1
Yunanistan	5	1	5	3	0

0 (Düzey 0): Rapor edilen vaka yok,
1 (Düzey 1): Sporadik vakalar rapor edilmiş,
2 (Düzey 2): Hastane salgını ya da salgınları rapor edilmiş,
3 (Düzey 3): Bölgesel yayılım rapor edilmiş,
4 (Düzey 4): Bölgeler arası yayılım rapor edilmiş,
5 (Düzey 5): Endemik durum

mıştır[55]. *Acinetobacter* Resistant to Imipenem (ARI-1) olarak adlandırılmış olsa da daha sonra sekans çalışmaları ile OXA grubuna ait olduğu tespit edilip OXA-23 olarak tekrar sınıflandırılmıştır[13]. OXA grubunda nonfermenter Gram negatif bakterilerde görülen birçok varyant enzim mevcuttur[52]. *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenemaz aktivitesi ön planda olan başlıca OXA tipi enzim ise OXA-48 enzimidir. OXA-48 geninin nokta mutasyonu ile oluşan ve benzer aktiviteye sahip diğer bir enzim OXA-181 enzimidir[7]. Karbapenem hidroliz aktiviteleri zayıftır. EDTA ve klavulanik asit ile zayıf inhibisyon gösterirler. OXA-48 tipi karbapenemaz, ilk olarak 2001 yılında Türkiye'de bir hastanın klinik izolatından elde edilen *K.pneumoniae* suşunda rapor edilmiştir[49]. Fransa, Almanya, İspanya, Hollanda, İngiltere gibi Avrupa ülkelerinde ve ülkemizden de hastane salgınları ve endemik bölgelerin sayısında artış söz konusudur (Tablo 2). İlk kez ülkemizde saptanması, Avrupa'da İtalya ve Türkiye'nin epidemiyolojik durumunun özellikle OXA-48 tipi karbapenemaz direnci için düzey 5 olarak belirlenmiş olması OXA-48 tipi karbapenemaz direncinin önemini artırmaktadır.

KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ENTEROBACTERIACEAE* SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Enterobacteriaceae spp. izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanması ve tanımlanması, karbapenem tedavisine yanıt alınamayan ciddi infeksiyonların tedavisinde yol gösterici olabilmektedir. Yine bu suşlarla kolonize hastaların tespiti ve izolasyonu gibi önlemler, oluşabilecek hastane infeksiyonlarının önüne geçilmesi açısından önemlidir. İnfeksiyon ve salgın analizleri için uygulanan moleküler yöntemler ise direnç yayılım mekanizmaları ve epidemiyolojisi hakkında önemli bilgiler sağlamaktadır.

Karbapenemaz saptanmasında kullanılan başlıca yöntemlere Tablo 3'te yer verilmiştir. Burada yöntemler fenotipik ve genotipik yöntemler olarak başlıca iki gruba ayrılmaktadır.

Tablo 3. *Karbapenemaz saptanmasında kullanılan başlıca yöntemler.*

Fenotipik yöntemler	Genotipik yöntemler
Kromojenik besiyerleri	PZR
Modifiye Hodge Testi	Klonlama ve sekanslama
İnhibitör bazlı yöntemler (çift disk sinerji, kombine disk testleri, kombine gradiyentli stripler, vs.)	Oligonükleotid hibridizasyonu
Biyokimyasal yöntemler	PGFE
MALDI-TOF MS	MLST
İmmünokromatografik yöntemler	

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu; PGFE: Darbeli alan jel elektroforezi;
MALDI-TOF MS: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi; MLST: Çoklu bölge sekans tiplendirme

Tablo 4. *EUCAST önerilerine göre karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae için kinik sınır değerler ve tarama eşik değerleri[15].*

	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zonları (mm) (10 µg disklerle)	
Karbapenem	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem	≤2	> 0.12	≥22	<25*
İmipenem	≤2	>1	≥22	<23
Ertapenem	≤0.5	> 0.12	≥25	<25

**Bazı durumlarda OXA-48 üreten izolatlar için zon çapı 26 mm'ye kadar ulaşabilmektedir.*
Bu nedenle, OXA-48 üreten Enterobacteriaceae salgınlarında, özgüllükte düşüş göze alınarak <27 mm tarama eşik değeri olarak kullanılabilir.

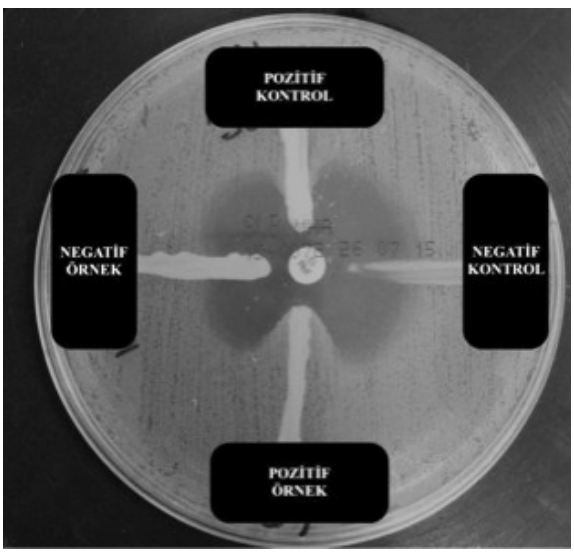
Fenotipik Yöntemler

Rutin mikrobiyolojik tanı uygulamalarında karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* spp. izolatları duyarlı, orta duyarlı ya da dirençli olarak karşımıza çıkabilmektedir. Karbapenemaz üretiminin saptanması için ilk olarak karbapenemlere karşı azalmış duyarlılık fenotipi gösteren suşların belirlenmesi gerekir. Dolayısıyla duyarlı olan suşlarda da yüksek MİK değeri, disk diffüzyon yönteminde küçük inhibisyon çapı gibi azalmış duyarlılık fenotipi ile karşılaşıldığında, karbapenemaz üretiminin sorgulanması gerekir. Bu durum beraberinde rutinin dışında özel laboratuvar disiplini ve prosedürü gerektirmektedir. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [15] ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI M100-S24)[9] kılavuzunda da bu izolatlarla ilgili eşik değerlerine ve laboratuvar uygulamalarına yer verilmiştir (Tablo 4). Güncel EUCAST versiyonu v.6.0'da uzman kurallar ve direnç mekanizmaları başlığı yer almayıp v.1.0'e yönlendirme mevcuttur.

Modifiye Hodge Testi

Modifiye Hodge testi (MHT) yoruma açık, zaman bağımlı bir test olmasına rağmen ulaşılabilir ve laboratuvara fazla maliyet getirmeyen bir test olduğundan sıkça kullanılan bir yöntemdir. Karbapenemaz üreten suşların, testte kulanılan karbapenemi inhibe etmesi sonucunda indikatör suş olarak kullanılan duyarlı *Escherichia coli* suşunun inhibisyon zonundaki değişikliği yorumlamayı esas alan bir testtir. Testin duyarlılığı ve özgüllüğü bakterinin ürettiği karbapenemaz çeşidine göre farklılık göstermektedir. Enzim genotipi için ileri çalışmaları gerektirmektedir.

CLSI kılavuzunda[9] tarif edildiği gibi, teste Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri, meropenem 10 µg diski ya da ertapenem 10 µg diski önerilmektedir. *E.coli* ATCC 25922 standart suşu indikatör olarak kullanılır. Buyyon ya da serum fizyolojik ile 0.5 McFarland bulanıklığında ayarlanan *E.coli* ATCC 25922 suşu solüsyonu 1:10 oranında dilüe edilip normal disk diffüzyon prosedürüne göre MHA besiyerine yayılır. Büyük petride yapılan testlerde (150 mm çap) 1-4 adet, küçük petride (100 mm çap) 1 adet meropenem 10 µg ya da ertapenem 10 µg diski yerleştirilir. Test edilecek suş, kanlı agar gibi seçici olmayan besiyerinde üretilmiş 24 saatlik kolonilerden alınmalıdır. Yuvarlak öze ya da eküvyonla alınıp diskin etrafındaki bir noktadan başlayıp uzaklaşan 20-25 mm uzunluğunda çizgi şeklinde ekim yapılır (Şekil 1). Etüvde, 35± 2°C'de 16-24 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirme yapılır. Testin yapıldığı her plakta

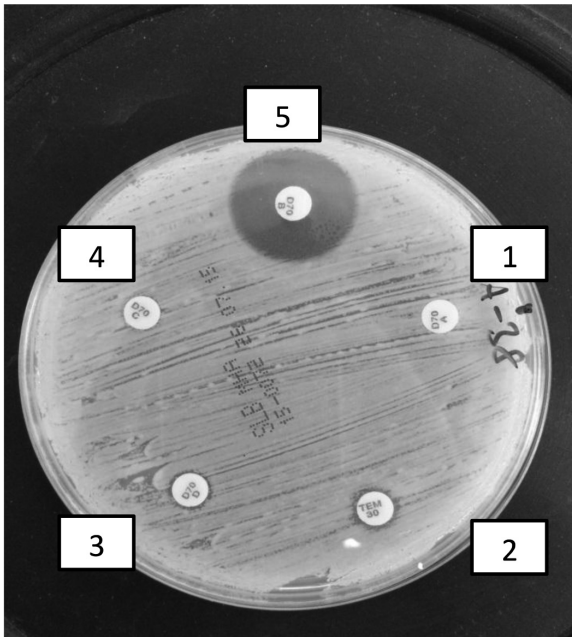


Şekil 1*. Modifiye Hodge Testi (MHT).*

negatif ve pozitif kontrollerin çalışılması testin güvenilirliği açısından önemlidir. *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705 pozitif kontrol, *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1706 negatif kontrol olarak önerilmektedir. Bazı test izolatları, standart suşun üremesi üzerine inhibitör etki yapabilir. Bu durumda test yorumlanamaz ve bu suşlar için MHT uygun bir yöntem değildir. MHT, belirtildiği gibi yoruma açık ve zaman bağımlı bir testtir. Ayrıca duyarlılığı her karbapenemaz türünde aynı değildir. Yapılan çalışmalarda KPC enzimi üreten suşlarda testin duyarlılığı % 100'e yakın bulunmuştur[23]. KPC üreten suşlarda sonuçlar başarılı iken OXA-48 ve MBL üreten suşları saptamada duyarlılığın nispeten düşük olup kullanılan disk ve besiyerine göre farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir[12,20,27]. Duyarlılığın düşük olması ve yanlış pozitiflikler bu testin modifikasyonlarını da beraberinde getirmiştir. MBL tespitinde duyarlılığı artırmak amacıyla MHA besiyerine Zn ilavesi, AmpC üretimi ve porin kaybı gibi direnç mekanizmalarına bağlı yanlış pozitiflik oranını engellemek için de besiyerine kloksasilin ilavesi yapılan ve olumlu sonuçlar sunan çalışmalar bulunmaktadır[20, 27].

Kombine disk metodu

Kombine disk metodu ulaşılabilir, maliyeti fazla olmayan, mekanizması dolayısı ile test edilen bakterinin genotipi hakkında fikir verebilen disk kombinasyonlarından oluşan testtir. Karbapenem ve karbapenemaz inhibitörlerinin sinerjisine dayalı bir yöntemdir. MBL inhibitörü olarak dipikolinik asit (DPA) veya EDTA, KPC inhibitörü olarak fenilboronik asit (PBA), AmpC ve porin kaybı birlikteliği ile gelişen karbapenem direncini ayırt etmek için de kloksasilin sinerjisi test edilir[3,35]. Test edilecek olan suşun taze pasajından 0.5 McFarland ayarlanıp MHA plağına disk difüzyon prosedürüne göre yayılır. Meropenem 10 µg, meropenem 10 µg +DPA (1000 µg), meropenem 10 µg +PBA (600 µg), meropenem 10 µg+ kloksasilin (750 µg) içeren diskler plağa yerleştirilir. Etüvde 16-24 saatlik inkübasyondan sonra disk zonlarının çapları yorumlanır. DPA veya EDTA ile sinerji MBL üretimi, APBA ya da PBA ile sinerji KPC, kloksasilin ile sinerji ise AmpC üretimi lehine yorumlanır (Şekil 2).



***Şekil 2**. NDM-1 üreten Klebsiella pneumoniae suşunun meropenem+DPA diski ile inhibisyonu.*

1-Meropenem, 2-Temosilin, 3-Meropenem+Kloksasilin-AmpC inhibitörü, 4-Meropenem+Boronik Asit-KPC inhibitörü, 5-Meropenem+Dipikolinik Asit (Metallobeta-laktamaz inhibitörü)

Kombine disk sinerji yöntemi, duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek oluşu, ulaşılabilir laboratuvar pratiğine sahip olması, maliyetinin düşük olması ve enzim sınıflandırılmasını sağlayan bir metot olması nedeniyle yaygın olarak kullanılma potansiyeli göstermektedir. Duyarlılık ve özgüllüğü çeşitli çalışmalarda genel olarak % 95 ve üzeri olarak çalışılmıştır[3,12,35]. D sınıfı beta-laktamazların (OXA-48 vs.) benzer aminoasit dizilimli geniş varyantlara sahip olması, spesifik inhibitör bulmayı zorlaştırmaktadır[57]. Bu nedenle OXA-48 tespitinde, bu testin modifikasyonuna veya genotipik testlere ihtiyaç duyulmaktadır. Yüksek temosilin direnci, OXA-48 enziminin saptanmasında iyi bir belirteç olarak önerilmiştir. Temosilin 30 µg diski, MHT gibi ilave protokoller yüksek duyarlılıkta ve özgüllükte OXA-48 saptama olanağı sağlamaktadır[3,25,57].

MBL için inhitör bazlı diğer bir test ise gradiyentli şerit testtir. Bu yöntemde imipenem ve imipenem+EDTA kombinasyonlu gradiyentli strip kullanılır[43]. Duyarlılığı imipenem+EDTA diskine yakın olmakla beraber rutin kullanımda disk metodu daha ulaşı-

labilir, ucuz bir yöntem olarak önerilmektedir[3,34].

Karbapenem İnaktivasyon Metodu

Yeni ve standardizasyon gerektiren fenotipik metottur. Karbapenemaz üretimi test edilecek suşla birlikte inkübasyona bırakılan karbapenem diskinin, bakterinin enzimiyle inaktivasyonunun fenotipik olarak gösterilmesini baz alanve temel laboratuvar pratiğinde ulaşılabilir, maliyeti düşük olan bir testtir[63]. Suda hazırlanan şüpheli bakteri süspansiyonuna meropenem diski atılıp iki saat inkübasyona bırakılır. İki saatin sonunda süspansiyon içindeki disk alınır ve karbapenem duyarlı standart suşun (*E.coli* ATCC 25922) yayıldığı MHA agar plağına konur. Altı saatlik inkübasyon sonrasında normalde *E.coli* suşunun etrafında inhibisyon zonu oluşması beklenirken, test edilen bakteride karbapenemaz varlığında inaktive olan meropenem diski *E.coli* suşunda inhibisyon zonu oluşturamaz. Böylece test edilen bakteride, karbapenemaz üretiminden bahsedilir[63]. Basit, ucuz ve kısa sürede sonuç potansiyeline sahip olarak değerlendirildiği için iyi bir alternatif olarak diğer fenotipik yöntemlerle kıyaslamaların yapıldığı çalışmalar mevcuttur[61,63]. Duyarlılığı Carba NP (bioMérieux, Fransa) ile benzerken, özgüllüğü daha düşük bulunmuştur[63]. Carba NP (bioMérieux, Fransa) çok kısa sürede sonuç verebilirken (10 dk-2 saat), karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) için en az sekiz saatlik inkübasyon (bazen bir gece) gerekmektedir[61,63]. Karbapenem inaktivasyon metodunda alınan bakteri miktarı, inkübasyon süreleri, disk içeriği, inhibisyon zon çapı gibi değişkenlerin standardize edilmeleri için çalışmalar gerekmektedir.

Biyokimyasal metotlar

Karbapenemaz üreten suşların, daha kısa sürede ve düşük maliyetle saptanması amacıyla geliştirilen yöntemlerden olan biyokimyasal metotlar, karbapenem hidroliz reaksiyonunun oluşturduğu pH değişikliğinin indikatör maddeler (fenol kırmızısı, brom-timol mavisi vb.) kullanılarak renk değişimi ile gösterilmesi esasına dayanan yöntemlerdir. Ticarileşen bir ürün olan fenol kırmızısı bazlı Carba NP testi ve brom timol bazlı Blue-Carba testi bu prensiple çalışan testlerdir[44,47]. Bu testler iki saat ve daha kısa sürede sonuç verebilme, yeni bir enzim de olsa herhangi bir karbapenemaz varlığını tespit edebilme potansiyeli gibi avantajlara sahiptirler. Nordmann ve ark.[44]'nın Carba NP testinin özgüllük ve duyarlılığını % 100 bulmalarına rağmen, çeşitli fenotipik testlerin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada daha düşük duyarlılık gözlenmiştir[14]. Yine Tijet ve ark.[60], Mitra ve ark.[36]'nın yaptıkları çalışmalarda duyarlılık % 80'in altında bulunmuştur. Bu farklılıkların çeşitli nedenleri olması muhtemeldir ve başlıca GES ve OXA-48 gibi, karbapenemler üzerindeki hidroliz etkisi zayıf olan karbapenemazlarda duyarlılığın daha düşük olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur[36,60].

Bir diğer biyokimyasal bazlı test olan Blue-Carba testinin özgüllük ve duyarlılığının da % 100'e yakın olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur[47]. In-house Carba NP ve Blue-Carba testlerinin karşılaştırıldığı diğer bir çalışmada her iki testin duyarlılığı % 100 olarak tespit edilmişken, özgüllükleri sırasıyla % 98.9 ve % 91.7 olarak bildirilmiştir[48]. Sonuç olarak biyokimyasal metoda dayalı bu iki test düşük maliyetle, kısa sürede, yüksek duyarlılık ve özgüllükte sonuç vermektedir. Rutin laboratuvarlarda bu özellikleri ile kullanıma uygun olarak değerlendirilmektedir.

Kültür bazlı metotlar

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının neden olduğu infeksiyonların önlenmesinde, kontrolünde ve sürveyansında rektal taramalarla kolonize hastaların hızlı tespiti ve izolasyonu önemli bir yer tutmaktadır[10,58]. Bu da çok sayıda servis hastasından alınan örneklerin taranmasını gerektirdiğinden kültür ve subkültür aşamasını hızlandıran, iş yükünü azaltan kültür bazlı metotlar ve prosedürler geliştirilmiştir. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından tanımlanan triptik soy buyyonlu yöntem, kromojenik besiyerleri ve çeşitli tarama besiyerleri bu amaçla kullanılmaktadırlar[8,65].

CDC, rektal sürüntü örneklerinde saptama yöntemi olarak triptik soy buyyonlu bir prosedür tanımlamıştır[8]. Bu yöntemde 5 ml triptik soy buyyon besiyerine 10 µg'lık karbape-

nem diski konur. Test edilecek rektal sürüntü örneği de bu hazırlanan sıvıya konarak bir gece inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında vortekslenip 100 µl'lik öze ile MacConkey agara ekim yapılır ve yine bir gece inkübe edilir. Laktoz pozitif morfoloji gösteren, oksidaz negatif koloniler MHT gibi ileri testlerle karbapenemaz üretimi yönünden test edilir. Diğer bir kültür bazlı yöntem olan *direkt karbapenem disk* yönteminde, klinik örneklerin ekiminden sonra ekim sahalarına karbapenem diski konur. İnkübasyon sonrasında zon içinde üreyen dirençli koloniler değerlendirilir[65].

Taramalarda kullanılan kromojenik besiyerleri ise Gram pozitif ve karbapenemaz üretmeyen Gram negatif bakterilerin üremesini inhibe eden spesifik ajanlar kullanılarak hazırlanan çeşitli besiyerleridir[64]. Klinik örneklerde ve rektal taramalarda hedeflenen kolonilerin rahatça seçilmesini sağlamakta, böylece karbapenemaz üreten bakterilerin saptanmasında subkültür ve pasajlamaya minimal gereksinimle zaman ve işlem basamaklarının kısaltılmasını hedeflemektedir.

CDC metodu, chromID CARBA besiyeri (bioMérieux, Fransa) ve imipenemli MacConkey agar (MCI) yöntemlerini değerlendiren bir çalışmada, chromID CARBA besiyeri (% 96.5) ve CDC metodunun (% 98.8) duyarlılık değerlerinin birbirine yakın ve MCI yönteminden (% 89) yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu testler arasında en yüksek özgüllük, % 91.2 ile chromID CARBA besiyerinde saptanmıştır. CDC metodunun özgüllüğü % 80.2, MCI metodununki % 31.9 olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışmada Gram boyama ilavesiyle metotların özgüllüklerinin arttığı gösterilmiştir[46]. Girlich ve ark.'nın[19] yaptığı karşılaştırmalı çalışmada SUPERCARBA, Brilliance CRE, CHROMagar KPC olmak üzere üç kromojenik ticari besiyerinin, çeşitli genotipte karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşlarını saptama performansları değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda duyarlılıkları sırasıyla % 96, % 76.3, % 43 iken; özgüllükleri % 60.7, % 57.1, % 67.8 olarak belirtilmiştir. SUPERCARBA besiyeri daha duyarlı ve özgül bulunmuştur. CHROMagar KPC besiyerinin NDM gibi B sınıfı beta-laktamazları saptama oranının (% 11) genel duyarlılığından dikkat çekici şekilde düşük olduğu gözlenmiştir.

Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS)

MALDI-TOF MS bakteri ve fungusların identifikasyonunda kullanılan, araştırma laboratuvarlarında ve rutin diagnostik pratiğinde yaygınlaşan kullanıma sahip analitik bir yöntemdir. Lazer ile küçük kütlelere ayrılan ve iyonize olan moleküllerin uçuş paterninin analizine dayanan bu yöntem, bakteride karbapenemaz varlığı durumunda karbapenem kullanılarak hidrolitik ürünlerin analizi sayesinde kısa sürede karbapenemaz üretimini saptayabilmektedir[6,18]. Ghebremedhin ve ark.'nın[18] yaptığı çalışmada, dirençli bakteriler katı besiyerindeki koloniden direkt olarak ve kan kültürü şişelerine ekim yapılıp bu şişelerden örnek alarak çalışılmıştır. Katı kültürden alınan örneklerde karbapenem hidrolizini saptama oranı *Enterobacteriaceae* suşları için % 100 bulunmuştur. Kan kültürü şişelerinden alınan örneklerde ise duyarlılık % 96 olarak belirtilmiştir. Testlerin 1-4 saat arasında sonuçlandığı belirtilmiştir. Yüksek duyarlılık ve özgüllük, test süresinin kısa olması, dolaşım sistemi infeksiyonları gibi hayati infeksiyonlarda kan kültürü şişesinden kısa sürede direnç analizi yapabilme potansiyeli gibi bir çok avantajı testi kullanışlı yapmaktadır. Yine Carvalhaes ve ark.[6] inkübasyon periyotlarını inceledikleri çalışmada 15 dk-4 saatlik inkübasyon aralığında başarılı bir şekilde karbapenemaz aktivitesini tespit etmişlerdir. MALDI-TOF MS yönteminde bakteri hidrolizi ile enzimin ekstrakte olmasını sağlayan hidrolitik solüsyonlar, testte kullanılacak karbapenem ve inkübasyon periyotları ile ilgili çalışmalar devam etmekle beraber MALDI-TOF MS ile 30 kadar karbapenemaz üreten bakteri türü için validasyonu yapılmıştır. Optimizasyon ve validasyon çalışmalarının artması ile daha yaygın kullanım alanı bulabilecektir[24].

İmmünokromatografi

İmmünolojik reaksiyon temelli bu yöntemde, kromatografik kağıtta sabitlenmiş antikorla örnekte bulunan antijenin birleşmesi sonu-

cu oluşan immune kompleks, kağıtta renk değişimi oluşturmakta ve böylece antijen ya da antikor varlığı test edilebilmektedir. Bu yöntem, karbapenemaz enzimlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar sayesinde karbapenemaz saptanması gibi direnç mekanizmalarının test edilmesinde de kullanım alanı bulmuştur. Glupczynski ve ark.[21] yaptıkları çalışmada immünokromatografik iki ticari lateral akımlı ürünü değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonucunda OXA-48 K-SeT ve KPC-K-SeT (Coris BioConcept) testlerinin duyarlılık ve özgüllüğü % 100 olarak saptanmıştır[21]. Notake ve ark.[45] IMP enziminin hızlı saptanması amacıyla geliştirilmiş Quick Chaser IMP (Saga, Japan) ticari kitini değerlendirdikleri çalışmada, IMP enziminin % 100 duyarlılık ve özgüllükte saptandığını belirtmişlerdir

Özgül immünolojik reaksiyon temelli olan bu yöntemde, belli bir enzimi yüksek özgüllük ve duyarlılıkta tespit edebilmek mümkündür. Bazı karbapenemaz tiplerinin endemik olduğu bölgelerde o enzime yönelik immünokromatografik testlerin kullanılması verimli olabilmektedir.

Genotipik metotlar

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Fenotipik metotların, ulaşılabilir olmaları ve basit donanım gerektirmeleri avantaj olmasına rağmen, sonuçlarının nihai olarak moleküler yöntemle doğrulanması gerekmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğün yüksek olduğu, hızlı ve fenotipi etkileyen faktörlerden korunmuş yöntemler olan moleküler yöntemler artık daha sık kullanılır olmuştur. PZR çeşitleri bu amaçla sık kullanılan yöntemlerdendir. Karbapenemaz tiplerinin primerleri bulunması halinde tek vaya çoklu olarak gerçek zamanlı PZR kullanılarak *bla*VIM, *bla*KPC, *bla*IMP, *bla*NDM, *bla*OXA-48 gibi yaygın görülen karbapenemaz tipleri 40 dk-6 saat gibi kısa zamandayüksek duyarlılık ve özgüllükte tespit edilebilmektedirler[17,37]. Findlay ve ark.'nın[17] eazyplex SuperBug complete A, Xpert Carba-R ve Check-Direct CPE olmak üzere PZR bazlıüç ticari kiti değerlendirdikleri çalışmada test süreleri sırasıyla ~20 dk, ~50 dk, ~2 saat verilen kitlerin üçünün de KPC, NDM, VIM, OXA-48 enzimlerini üreten suşları başarıyla tespit ettikleri belirtilmiştir. OXA-181 geninin eazyplex SuperBug complete A ve Xpert Carba-R kitlerinde çalışılmadığı, ama modifiye kitlerinde mevcut olduğu, IMP geninin ise yalnız Xpert Carba-R kitinde çalışıldığı belirtilmiştir. Üç testte de yanlış pozitiflik saptanmamıştır. KPC, NDM ve VIM, OXA-48 tipi genotiplerde üç testin duyarlılığı % 100 olarak bulunmuştur. Sekans çalışmaları ile OXA-181 olduğu tespit edilen OXA-48 benzeri genotipinde ise Check-Direct CPE kitinin duyarlılığı % 100 iken diğer iki kitin duyarlılığı % 83 olarak belirtilmiştir.

Diğer bir PZR yöntemi olan "Loop-mediated isothermal amplification" (LAMP) 4-6 primer kullanılarak izotermal şartlarda (60-65°C), 60 dk gibi kısa sürede çok büyük miktarda amplifikasyon ürünü oluşturan bir yöntemdir. Normal PZR'a göre daha hızlı ve özgül sonuçlar sunduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Qi ve ark.[51]'da LAMP ile NDM-1 genini % 100 duyarlılıkta saptamışlardır. Bu önemli avantajlarına rağmen moleküler metotların maliyetlerinin yüksek olması ve özel donanım/ deneyim gerektirmeleri nedeniyle karbapenem direnci gibi özel direnç gruplarının bu yöntemlerle çalışılması her laboratuvar için mümkün olmamaktadır. Bu yöntemlerin diğer bir dezavantajı ise tanımlanmamış yeni veya varyant genlerin tespit edilememesidir. Bu nedenle karbapenem dirençli bir suşta negatif bir moleküler test sonucu yalnızca primerleri kullanılan, bilinen genleri dışlayabilmekte; direnç mekanizmasının tanımlanabilmesi için suşun referans laboratuvarlara gönderilerek klonlama, sekanslama gibi ileri genotipik teknikler uygulanması gerekmektedir[38].

Oligonükleotid Hibridizasyon Yöntemi

DNA hibridizasyon yöntemi mikroçip formatında, bir örnekten kısa sürede önemli alt tipleri çalışabilen, duyarlı ve özgül bir karbapenemaz saptama yöntemi olarak birçok avantaja sahiptir[62]. Yöntemin adımları şu şekildedir: 1)Bakteriyel DNA'nın izolasyonu, 2) Biyotinle işaretli dUTP nükleotidleri eklenerek PZR ile amplifikasyon, 3) Amplifiye olan genin oligonükleotidleri ile mikroçipteki primer probların hibridizasyonu, 4) Hibridizasyon sonunda işaretlenmiş nükleotidlerin floresan

ışımasının okunması[62]. GSBL ve karbapenemaz saptamada validasyona sahip ticari ürünler de mevcuttur[40]. Bu çalışmalarda test süresi DNA ekstraksiyonu da dahil 4-7 saat olarak verilmiş olup, özgüllük ve duyarlılık % 100 olarak saptanmıştır. Mikro kuyucuklardan oluşan mikroçiplerde aynı örnekte KPC, OXA, NDM, VIM, IMP gibi başlıca enzimler; bunların varyantları ve GSBL enzimleri test edilebilmektedir. Böylece alt grupların atlanmaması sağlanmakta, GSBL ve karbapenemaz varlığı ve birlikteliği kısa sürede başarıyla saptanabilmektedir[40,62]. Bu avantajlarına rağmen, prosedürün yetkin laboratuvar ve fazla maliyet gerektirmesi ulaşılabilirlik açısından dezantaj olarak değerlendirilebilmektedir. Rutin laboratuvarlarda kullanımının yaygınlaşması zor gibi gözükmekle beraber araştırma ve referans laboratuvarları için uygundur.

Klonal ilişkinin moleküler analizi

Moleküler yöntemler, karbapenemaz genlerinin tespiti dışında epidemiyolojik çalışmalarda da kullanılmaktadır. Yüksek riskli suşların analizlerinin yapılması, potansiyel salgın ve yayılımların tespiti, klonal ilişkilerin araştırılması, salgın suşu ve sporadik suşların karşılaştırılması gibi sürveyans için gerekli çalışmalarda kullanılmaktadır[11,33]. "*Pulsed field gel electrophoresis*" *(PFGE)* bu amaçla sık kullanılan yöntemlerdendir. Bu yöntemde spesifik restriksiyon enzimleri ile bakteriyel genom belirli yerlerinden kesilir. Periyodik elektriksel alan uygulaması ile oluşan DNA fragmentlerinin oluşturduğu patern, belli kriterlere göre yorumlanıp klonal ilişkiler ve yakınlık dereceleri incelenir[11,33,59]. Cubero ve ark.[11] PFGE ile izogenik olduklarını tespit ettikleri suşların neden olduğu *K.pneumoniae* infeksiyonları bildirmişlerdir. Diğer bir çalışmada Marsh ve ark.[33] KPC pozitif suşlarla gelişen endoskop ilişkili bir salgının genomik epidemiyolojisini PFGE ile incelemişlerdir. Sekans analiz yöntemlerinden multilokus sekans tipleme (MLST), moleküler epidemiyolojide kullanımı yaygınlaşan yöntemlerdendir[22]. Bakteri yapısal genlerinin internal parçalarının DNA dizisindeki allellerini tanımlamaya dayalı bir yöntemdir. Her izolat için lokustaki alleller, sekans tipini ve allellik profilini belirler. Bu yöntemle sekans tiplemesi yapılarak spesifik direnç geni prevalansı, farklı coğrafyalardaki allellik profilleri, suşların bölgesel ya da global yayılımı izlenebilmektedir[22]. MLST ile yapılan bir çalışmada, İsviçre'deki NDM üreten suşlarla Hindistan ve Balkanlar'daki suşlar arasında ilişki tespit edilmiştir[50]. Yine yapılan sekans çalışmaları sonucunda, ST258 tipinin KPC enziminin global yayılımı ile ilişkisi gösterilmiştir[66].

SONUÇ

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının hızlı ve doğru identifikasyonu, kısıtlı tedavi seçeneklerinin değerlendirilmesi, infeksiyonun kontrolü ve sürveyans analizleri için gereklidir.

Karbapenemazların genotipik ve fenotipik çeşitliliği, bu enzimlerin identifikasyonunda zorlukları da beraberinde getirmektedir. Enzimlerin aktif bölgelerinin farklılık göstermesi ve hidrolitik aktivitelerinin farklı olması, çeşitli testlerin geliştirilme gerekliliğini ve bu testlerin performaslarındaki farklılıkları beraberinde getirmiştir.

Direncin fenotipik olarak saptanması, fenotipik metotlarla başlayan ve genotipik çalışmalara kadar giden bir algoritma başlatmaktadır. Hızlı, duyarlı, özgül ve fenotipik koşullardan etkilenmeyen sonuçlar sundukları için genotipik yöntemlerin kullanımı yaygınlaşmaktadır. Fenotipik yöntemlerse ulaşılması ve pratiği daha basit yöntemler olarak direncin saptanması ve direnç mekanizmalarının aydınlatılmasında önemli yere sahiptirler. Direnç mekanizmaları aydınlandıkça mekanizmaya özgü, başarılı ve çoğu laboratuvarın ulaşabileceği potansiyele sahip fenotipik yöntemler gelişmektedir. Her ne kadar bu testlerin standardize edilip basit bir algoritma oluşturulması için ek çalışmalara gereksinim olsa da, fenotipik ve genotipik yöntemlerin arasından laboratuvarın sahip olduğu olanaklara uygun bir algoritma seçilerek duyarlı ve özgül sonuçlar almak mümkündür.

KAYNAKLAR

1. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann

H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Pruducing Enterobacteriaeceae (EuSCAPE) working group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries, *Euro Surveill* 2015;20(45).
2. Ambler RP, Coulson AF, Frère JM et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases, *The Biochemical Journal* 1991;276(Pt 1):269-70.
3. 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;6:13.
4. Berrazeg M, Diene S, Medjahed L et al. New Delhi metallo-beta-lactamase around the world: An ereview using google maps, *Euro Surveill* 2014; 19(20).
5. Bratu S, Landman D, Haag R et al. Rapid spread of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium, *Arch Intern Med* 2005;165(12): 1430-5.
6. Carvalhaes CG, Silva ACR, Streling AP et al. Detection of carbapenemase activity using VITEK MS: interplay of carbapenemase type and period of incubaiton, *J Med Microbiol* 2015;64(8):946-7.
7. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program, 2006-2007, *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55(3):1274-8.
8. CDC Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing, Klebsiella spp. and E. coli from Rectal Swabs Center for Disease Control.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI M100.S24
10. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA,Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant Microorganisms. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae, *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36(3):205-10.
11. Cubero M, Cuervo G, Dominguez MÁ et al. Carbapenem-resistant and carbapenem-susceptible isogenic isolates of Klebsiella pneumoniae ST101 causing infection in a tertiary hospital, *BMC Microbiol* 2015;15:177.
12. Demiray T, Altindis M, Aydemir AO, Kilic U, Mehmet K. Comparison of Combined Disc Test and Modified Hodge Method in Clinical Isolates of NDM-1 and NDM-1+OXA-48 positive Klebsiella pneumonia. The 7th Eurasia Congress of Infectious Diseases, *Tbilisi Georgia* 2015; p.P-20.
13. Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in Acinetobacter baumannii 6B92, *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44(1):196-9.
14. Dortet L, Agathine A, Naas T, Cuzon G, Poirel L, Nordmann P. Evaluation of the RAPIDEC® CARBA NP, the Rapid CARB Screen® and the Carba NP test for biochemical detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *J Antimicrob Chemother* 2015;70(11):3014-22.
15. EUCAST EUCAST Clinical Breakpoint Table v.6.0. 2013.
16. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections, *Emerg Infect Dis* 2014;20(7):1170-5.
17. 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, *J Antimicrob Chemother* 2014;70(5):1338-42.
18. Ghebremedhin B, Halstenbach A, Smiljanic M, Kaase M, Ahmad-Nejad P. MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials, *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2016;15(1):5.
19. 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, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 75(2):214-7.
20. 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.
21. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I et al. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria, *J Antimicrob Chemother* 2016.
22. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to

detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods, *J Microbiol Methods* 2014;107:106-18.

23. Hirsch EB, Chang KT, Zucchi PC et al. An evaluation of multiple phenotypic screening methods for Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae, *J Infect Chemother* 2014;20(3):224-7.
24. Hrabák J, Chudácková E, Walková R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDITOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis, *Clin Microbiol Rev* 2013;26(1):103-14.
25. Huang TD, Berhin C, Bogaerts P, Glupczynski Y. Evaluation of avibactam-supplemented combination disk tests for the detection of OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79(2):252-4.
26. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M et al. Multiyear, multinational survey of the incidence and global distribution of Metallo-β-Lactamase-producing Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa, *Antimicrob Agents Chemother* 2015;60(2):1067-78.
27. Kim HK, Park JS, Sung H, Kim MN. Further modification of the modified hodge test for detecting metallo-β-lactamase-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, *Ann Lab Med* 2015;35(3):298-305.
28. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB et al. Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258, *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(8):3365-70.
29. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study, *Lancet Infect Dis* 2010;10(9):597-602.
30. Kuwabara S, Abraham EP. Some properties of two extracellular beta-lactamases from Bacillus cereus 569/H, *Biochem J* 1967;103(3):27C-30C.
31. Lolans K, Queenan AM, Bush K, Sahud A, Quinn JP. First nosocomial outbreak of Pseudomonas aeruginosa producing an integron-borne metallo-beta-lactamase (VIM-2) in the United States, *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49(8):3538-40.
32. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae in a hospital in Crete (Greece), *J Infect* 2009;58(3):213-9.
33. Marsh JW, Krauland MG, Nelson JS et al. Genomic epidemiology of an endoscope-associated outbreak of Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC)-Producing K. pneumoniae, *PLoS One* 2015;10(12):e0144310.
34. 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.
35. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Bou Casals J, Tzouvelekis LS. Combined disc methods for the detection of KPC- and/or VIM-positive Klebsiella pneumoniae: improving reliability for the double carbapenemase producers, *Clin Microbiol Infect* 2013;19(9):E412-5.
36. Mitra S, Kazi M, Panchal M, Rodrigues C, Shetty A. Evaluation of Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae, *Indian J Med Microbiol* 2015;33(4):603-6.
37. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR, *J Antimicrob Chemother* 2012;67(4):906-9.
38. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in Acinetobacter baumannii, *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53(8):3579-81.
39. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of Klebsiella pneumoniae carbapenemases, *Lancet Infect Dis* 2013;13(9):785-96.
40. 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, *J Clin Microbiol* 2011;49(4):1608-13.
41. Nabarro LE, Veeraraghavan B. Combination therapy for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: increasing evidence, unanswered questions, potential solutions, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015;34(12):2307-11.
42. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Emerg Infect Dis* 2011;17(10):1791-8.
43. Nordmann P, Poirel L, Carrër A, Toleman MA,

Walsh TR. How to detect NDM-1 producers, *J Clin Microbiol* 2011;49(2):718-21.
44. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Emerg Infect Dis* 2012;18(9):1503-7.
45. Notake S, Matsuda M, Tamai K, Yanagisawa H, Hiramatsu K, Kikuchi K. Detection of IMP metallo-β-lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting gram-negative rods by immunochromatography assay, *J Clin Microbiol* 2013;51(6):1762-8.
46. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M et al. Performance of chromID® CARBA medium for carbapenemases-producing enterobacteriaceae detection during rectal screening, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014;33(1):35-40.
47. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures, *J Clin Microbiol* 2013;51(12):4281-3.
48. Pires J, Tinguely R, Thomas B, Luzzaro F, Endimiani A. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *J Microbiol Methods* 2016;122:33-7.
49. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):15-22.
50. Poirel L, Schrenzel J, Cherkaoui A, Bernabeu S, Renzi G, Nordmann P. Molecular analysis of NDM-1-producing enterobacterial isolates from Geneva, Switzerland, *J Antimicrob Chemother* 2011;66(8):1730-3.
51. Qi J, Du Y, Zhu X, Bai H, Luo Y, Liu Y. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of NDM-1 gene, *Microb Drug Resist* 2012;18(4):359-63.
52. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases, *Clin Microbiol Rev* 2007;20(3):440-58.
53. Saino Y, Kobayashi F, Inoue M, Mitsuhashi S. Purification and properties of inducible penicillin β-lactamase isolated from Pseudomonas maltophilia, *Antimicrob Agents Chemothe*r 1982;22(4):564-70.
54. Samra Z, Ofir O, Lishtzinsky Y, Madar-Shapiro L, Bishara J. Outbreak of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel, *Int J Antimicrob Agents* 2007;30(6):525-9.
55. Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in Acinetobacter species from a clinical source, *J Antimicrob Chemother* 1995;36(3):585-6.
56. Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L;Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006,*Am J Infect Control* 2007;35(10 Suppl 2):S165-93.
57. Song W, Hong SG, Yong D et al. Combined use of the modified hodge test and carbapenemase inhibition test for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and metallo-β-lactamase-producing Pseudomonas spp., *Ann Lab Med* 2015;35(2):212-9.
http://dx.doi.org/10.3343/alm.2015.35.2.212
58. Souli M, Galani I, Antoniadou A et al. An outbreak of infection due to (beta)-lactamase Klebsiella pneumoniae carbapenemase 2-producing K. pneumoniae in a Greek university hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes, *Clin Infect Dis* 2010;50(3):364-73.
59. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing, *J Clin Microbiol* 1995;33(9):2233-9.
60. 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, *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57(9):4578-80.
61. Tijet N, Patel SN, Melano RG. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test, *J Antimicrob Chemother* 2016;71(1):274-6.
62. Ulyashova CE1, Khalilova YI, Rubtsova CE, Edelstein CE, Alexandrova IA, Egorov CA. Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D, *Acta Naturae* 2010;2(3):101-9.
63. 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.

64. Vasoo S, Lolans K, Li H, Prabaker K, Hayden MK. Comparison of the CHROMagar™ KPC, Remel Spectra™ CRE, and a direct ertapenem disk method for the detection of KPC-producing Enterobacteriaceae from perirectal swabs, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;78(4):356-9.
65. Vrioni G, Voulgari E, Ranellou K et al. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs, *J Clin Microbiol* 2012;50(6):1841-6.
66. Walsh TR. The emergence and implications of metallo-β-lactamases in Gram-negative bacteria, *Clin Microbiol Infect* 2005;11(Suppl 6):2-9.
67. Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance, *FEMS Microbiol Rev* 2011;35(5):736-55.
68. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of Klebsiella pneumoniae, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(4):1151-61.