



## KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN ENTEROBACTERİCEAE İZOLATLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ SIKLIĞI VE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI\*

Investigation of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production Frequency and Carbapenemase Activity of Enterobacteriaceae Strains Isolated from Blood Cultures

Aynur EREN TOPKAYA<sup>1</sup>, Mine AYDIN KURÇ<sup>1</sup>, Özge TOMBAK<sup>2</sup>, Dumrul GÜLEN<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ-Türkiye.

<sup>2</sup> Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Sağlık Uygulama Ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Tekirdağ-Türkiye.

\* Bu çalışmanın bir bölümü 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri' nde sunulmuştur. P-64 (1-3 Nisan 2016, İstanbul)

### Öz

**Amaç:** Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri kan kültürlerinde ürediklerinde daima etken olarak kabul edilmektedirler. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten çoklu ilaca dirençli Enterobacteriaceae izolatlarına bağlı enfeksiyonların tedavisinde karbapenemler kullanılmaktadır. Karbapenemlerin, özellikle GSBL üreten bakteriler ile oluşan ciddi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılması, karbapenemaz üreten suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmada; kan kültürlerinde üreyen Enterobacteriaceae (*E. coli* ve *K. pneumoniae*) izolatlarında GSBL sıklığı ve karbapenemaz varlığı fenotipik yöntem ve moleküler yöntem ile araştırılmıştır.

**Materyal ve Metot:** Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.01.2013-30.04.2016 tarihleri arasında gönderilen kan örneklerinden izole edilen 56 *E. coli* ve 11 *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya alınmıştır. İzolatların GSBL varlığı Clinical and Laboratory Standards (CLSI) önerilerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon ve kombine disk yöntemi ile çalışılmıştır. Karbapenemaz aktivitesi ise; karbapenemlerden herhangi biri için inhibisyon zonu <28 mm olarak ölçülen izolatlarda, fenotipik yöntem olarak MASTDISCS ID ve temosilin diski kullanılarak araştırılmış ve moleküler yöntem olarak PCR ile çalışılarak sonuçlar karşılaştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışmaya alınan 56 *E. coli* izolatının 30'u ve 11 *K. pneumoniae* izolatının altısında GSBL pozitifliği saptanmıştır. MASTDISCS ID ve temosilin diski ile üç *E. coli* izolatında metallo-beta-laktamaz (MBL), dördünde ise OXA-48 varlığı tespit edilmiştir. PCR ile MBL pozitifliği saptanmamış ancak dört izolatta OXA geni tespit edilmiş ve iki izolatın OXA tipi belirlenememiştir.

**Sonuç:** Sonuç olarak, hastanemizde üç yıl içinde kan kültürlerinde üreyen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında yüksek GSBL pozitifliği (%54) saptanmıştır.

GSBL pozitif beş izolattan üçünde PCR ile karbapenemaz varlığı da tespit edilmiştir. Ayrıca ülkemizde karbapenemaz olarak OXA-48 tipi yaygın olduğundan MASTDISCS ID' nin yanında temosilin diskinin kullanılması gerekmektedir.

**Anahtar kelimeler:** Kan kültürü, GSBL, karbapenemaz, *E. coli*, *K. pneumoniae*.

### Abstract

**Aim:** The members of Enterobacteriaceae family are always accepted as pathogenic when they are isolated from blood cultures. The carbapenems are preferred for the treatment of serious infections caused by ESBL producing multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolates. Carbapenems are used extensively for treatment of serious infections caused by ESBL producing bacteria, this situation leads to emerging of carbapenemase producing strains. The main purposes of this study were to investigate ESBL positivity and the presence of carbapenemase by phenotypic method and molecular method from Enterobacteriaceae (*E. coli* and *K. pneumoniae*) strains isolated from blood cultures.

**Material and Method:** 56 *E. coli* and 11 *K. pneumoniae* isolates isolated from the blood samples sent to the Namık Kemal University Health Practice and Research Center Microbiology Laboratory between 01.01.2013 and 30.04.2016 were taken to the study. ESBL positivity were determined by Kirby-Bauer disc diffusion method based on suggestion of Clinical and Laboratory Standards (CLSI). The zone diameter of carbapenem; measured as <28 mm diameter of isolates then, carbapenem activity was determined by using of MASTDISCSID Carbapenemase Detection Set and temocillin disc as phenotypic methods and by using of PCR as the molecular method and the results of these methods were compared.

**Results:** In this study, ESBL positivity for 30 of 56 *E. coli* and 6 of 11 *K. pneumoniae* isolates were detected. Metallo-beta-lactamase (MBL) was detected in three *E. coli* isolates with the MASTDISCS ID and the temocillin disc, and the presence of OXA-48 in the fourth. PCR did not detect MBL positivity but OXA gene was detected in four isolates and OXA type of two isolates could not be determined.

**Conclusion:** As a result of this study, it was seen that the rate ESBL positivity were high for *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates from the blood culture samples in our hospital (54%) during three years. The presence of carbapenemase were detected by PCR in three out of five ESBL positive isolates. In addition, if OXA-48 type is common as carbapenemase in your country, it is necessary to use a temocillin disc beside MAST DISCS ID.

**Key words:** Blood culture, ESBL, carbapenemase, *E. coli*, *K. pneumoniae*

### Corresponding Author / Sorumlu Yazar:

Mine AYDIN KURÇ  
Adres: Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi,  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tekirdağ-Türkiye  
E-posta: mineaydines@gmail.com

### Article History / Makale Geçmişi:

Date Received / Geliş Tarihi: 29.06.2018  
Date Accepted / Kabul Tarihi: 30.10.2018

## GİRİŞ

Kan dolaşımı enfeksiyonlarına neden olan Gram negatif enterik çomaklar çoğunlukla çoklu antibiyotik direncine sahiptir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten çoklu ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarına bağlı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla karbapenemler tercih edilmektedir. Karbapenemlerin GSBL üreten bakteriler ile oluşan ciddi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılması, karbapenemaz üreten suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Uzun süre hastanede yatış, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanılması, invazif girişimler, mekanik ventilasyon, total parenteral beslenme ve nazogastrik sonda uygulaması gibi durumlar karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarıyla gelişen enfeksiyonlar için risk faktörleri olarak tanımlanmıştır<sup>1</sup>. Karbapenemaz ve GSBL pozitif izolatların neden olduğu sepsis olguları için tedavi seçenekleri oldukça kısıtlıdır.

*Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direncine neden olan karbapenemaz enzimleri; 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) olarak sınıflandırılmaktadır<sup>2</sup>. Ülkemizde en sık tespit edilen karbapenemaz OXA-48 olmakla birlikte; IMP, VIM ve NDM gibi metallo-beta-laktamazların (MBL) da bulunduğu bildirilmiştir<sup>3</sup>.

*Enterobacteriaceae* izolatlarında, karbapenemaz ve GSBL varlığının rutinde test edilmesi önerilmemekte ancak, enfeksiyon kontrolü ve epidemiyolojik verilerin toplanması için gerekli olduğu belirtilmektedir. Kan dolaşımı enfeksiyonlarının tedavisinin doğru

yönlendirilmesi ve enfeksiyonların kontrolü için antimikrobiyal direnç ile ilgili sürveyans verilerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada; kan kültürlerinde üreyen *Enterobacteriaceae* (*E. coli* ve *K. pneumoniae*) izolatlarında GSBL sıklığı ve karbapenemaz varlığı araştırılmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### İzolatların Toplanması

Namık Kemal Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.01.2013-30.04.2016 tarihleri arasında Yoğun Bakım Ünitesi (YBÜ), hematoloji ve onkoloji servislerinden gönderilen kan kültürlerinden elde edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları çalışmaya alınmıştır. Kan kültürü örnekleri BACTEC 9050 (Becton Dickinson, ABD) sistemi kullanılarak KLİMUD (Klinik Mikrobiyoloji Uzmanlık Derneği) Kan Dolaşımı Örnekleri Rehberi'ne göre değerlendirilmiştir. Kan kültüründe üreyen ve etken olarak kabul edilen Gram negatif çomaklar; VITEK2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi kullanılarak tanımlanmıştır. Kan dolaşımı enfeksiyon etkeni olan 56 *E. coli* ve 11 *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 67 izolat, GSBL ve karbapenemaz çalışmaları için -20°C'de stoklanmıştır.

### GSBL Varlığının Araştırılması

İzolatlarda GSBL varlığını taramak ve doğrulamak için, CLSI önerileri doğrultusunda; kombine disk yöntemi ile sefotaksim (30 µg), sefotaksim (30 µg)/klavulanik asit (10 µg) ve seftazidim (30 µg)/seftazidim (30 µg)/klavulanik asit (10 µg) diskleri kullanılmıştır (CLSI M100-S25).

## Karbapenemaz Varlığının MASTDISCS ID ve Temosilin Diski ile Belirlenmesi

İzolatların karbapenem duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş ve Clinical and Laboratory Standards (CLSI) önerilerine göre değerlendirilmiştir<sup>4</sup>. Duyarlılık testleri için imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) ve ertapenem (10 µg) diskleri kullanılmıştır. CLSI' ye göre ertapenem inhibisyon zonu ≤22 mm ve EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)'a göre

meropenem inhibisyon zonu <28 mm olan izolatların karbapenemaz açısından taranması önerilmektedir<sup>4,5</sup>. Çalışmamızda CLSI ve EUCAST önerileri birlikte değerlendirilerek karbapenemaz varlığı araştırılacak izolatlar belirlenmiş, MASTDISCS ID Carbapenemase Detection Set ve temosilin (TEM, 30 µg) kullanılarak karbapenemaz aktivitesi çalışılmıştır (Tablo 1). Standart suş olarak; *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılmıştır.

**Tablo 1.** MASTDISCS ID Carbapenemase Detection Set ve temosilin disk yorumlama kriterleri (zon çapları)

MASTDISCS ID	Disk A	Disk B	Disk C	Disk D	Temosilin Diski
Disk İçeriği	MEM	MEM+DP	MEM+BO	MEM+Kloksasilin	Temosilin
Yorumlama kriteri	-	B-A ≥ 5mm	C-A ≥ 4mm	D-A ≥ 5 mm	<11 mm
		MBL (+)	KPC (+)	AmpC (+)	OXA-48 (+)

MEM: Meropenem, DP: Dipikolinik asit, MBL: Metallo beta-laktamaz, KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase.

## Moleküler Yöntemle Karbapenemaz

### Genlerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda önerilen kriterlere göre karbapenemaz şüpheli 10 izolatın; karbapenem direnç genlerinin amplifikasyonu PCR ile yapılmıştır. İzolatlar önce EMB, ardından %5 koyun kanlı agarda tek koloni olarak elde edilmiştir. Gen ve izolasyon başarısının kontrolünde, OXA-48 taşıyan lokal *E. coli* izolatı (EC61) kullanılmıştır. İzolatların DNA izolasyonu CDC (Centers for Disease Control and Prevention) tarafından yayınlanan çalışma protokolü modifiye edilerek gerçekleştirilmiştir<sup>6</sup>. Özetle, kanlı agardaki kolonilerden alınan bir öze dolusu bakteri, içinde 1 ml steril saf su bulunan tüp içinde süspanse edilmiştir. Tüpler 5000 rpm'de 10 dk santrifüjlendikten sonra içerindeki sıvı tamamen uzaklaştırılarak, örnek içine 25 µl saf su pipetlenerek çözülmüştür. Üzerlerine 25 µl 0.1 N NaOH eklendikten sonra, tüp içeriği 500 µl' lik tüpe alınıp termal döngü cihazında 99°C'de 10 dakika bekletilmiştir. Süre sonunda tüpler 3-5 dakika buz üstünde soğutulduktan sonra tüplere 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)' den

18 µl eklenerek nötralizasyon yapılmıştır. Daha sonra tüplere 400 µl steril soğuk saf su eklenip örnek ile karışması sağlanmıştır. Örnekler maksimum hızda 3 dk santrifüj edilerek, süpernatant yeni bir tüpe alınmış ve çalışılıncaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

Amplifikasyonda direnç ile ilişkili en sık rastlanan *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES-2</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>IMI(NMC)</sub>, *bla*<sub>SME</sub> ve *bla*<sub>OXA</sub> genlere ait özgül primerler kullanılmıştır (Tablo 2). Bu amaçla her biri 0.5 µM olacak şekilde forward ve reverse primerler, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM her bir dNTP, 2.5 U/reaksiyon Taq polimeraz enzimi (Promega, ABD) ve 1X yoğunlukta tampon içeren karışım hazırlanarak içine izole DNA örneklerinden eklenmiştir. Termal döngü cihazına (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD) yüklenen örnekler 94°C'de 5 dakika denatüre edildikten sonra, 40 döngü halinde 94°C'de 30 saniye, ilgili bağlanma sıcaklığında 80 saniye, 72°C'de 1 dakika olarak amplifikasyon yapılmıştır. PCR ürünleri 0.5µg/ml etidyum bromür ve %2' lik agaroz içeren jelde

yürütülerek, UV Transilluminatör altında görüntülenerek bant varlıkları araştırılmıştır.

**Tablo 2.** Karbapenemaz genlerinin belirlenmesi için kullanılan primerler

Primer	Primer Dizileri <sup>a</sup>	Bant Büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	5'-GATACCACGTTCCGTCTGG-3' 5'-GCAGGTTCCGGTTTTGTCTC-3'	246	7
<i>bla<sub>GES-2</sub></i>	5'-GTTTTGCAATGTGCTCAACG-3' 5'-TGCCATAGCAATAGGCGTAG-3'	371	8
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	5'-AGTGGTGAGTATCCGACAG-3' 5'-ATGAAAGTGCCTGGAGAC-3'	261	9
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	5'-CTACCGCAGCAGAGTCTTTG-3' 5'-AACCAAGTTTTGCCTTACCAT-3'	587	9
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	5'-ACACAATACATATCAACTTCGC-3' 5'-AGTGTGTTAGAAATGGTGATC-3'	813	10
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3' 5'-GAGCACTTCTTTGTGATGGC-3'	744	11
<i>bla<sub>OXA-23</sub></i>	5'-GATCGGATTGGAGAACCAGA-3' 5'-ATTTCTGACCGCATTTCAT-3'	501	11
<i>bla<sub>OXA-51</sub></i>	5'-TAATGCTTTGATCGGCCTTG-3' 5'-TGGATTGCATTCATCTTGG-3'	353	12
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	5'-TCGATCCCAACGGTGATATT-3' 5'-TGGATCAAGCAGGAGATCAA-3'	287	11
<i>bla<sub>SPM</sub></i>	5'-AAAATCTGGGTACGCAAACG-3' 5'-ACATTATCCGCTGGAACAGG-3'	271	13
<i>bla<sub>GIM</sub></i>	5'-TCGACACACCTTGGTCTGAA-3' 5'-AACTTCCAACCTTGGCATGC-3'	477	13
<i>bla<sub>IMI(NMC)</sub></i>	5'-TGCGGTCGATTGGAGATAAA-3' 5'-CGATTCTTGAAGCTTCTGCG-3'	399	14
<i>bla<sub>SME</sub></i>	5'-ACTTTGATGGGAGGATTGGC-3' 5'-ACGAATTCGAGCATCACCAG-3'	551	14

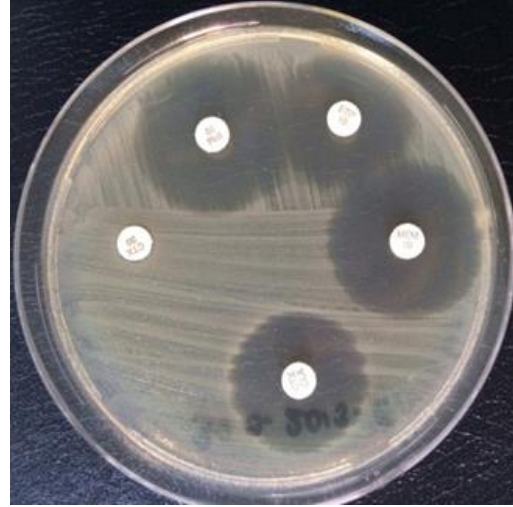
<sup>a</sup> Primer çiftlerinin önce Forward sonra Revers primeri belirtilmiştir.

## BULGULAR

Tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına 01.01.2013-30.04.2016 tarihleri arasında gönderilen kan kültürlerinden elde edilen toplam 67 izolat çalışmaya alınmıştır. Çalışmamızda, 56 *E. coli* izolatının 30'unda ve 11 *K. pneumoniae* izolatının altısında olmak üzere toplam 36 izolatta (%53.7) GSBL pozitifliği saptanmıştır.

Disk difüzyon yöntemi ile imipenem, meropenem ve ertapenem zon çapları değerlendirildiğinde 7 *E. coli* ve 3 *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 10 izolat karbapenemaz şüpheli bulunmuştur. Bu izolatlarda MASTDISCS ID ve temosilin diski ile karbapenemaz aktivitesine bakıldığında 10 izolatın üçünde MBL pozitifliği ve dördünde ise

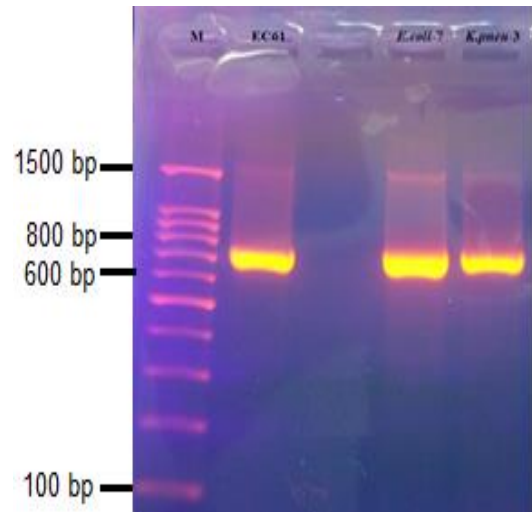
OXA-48 varlığı tespit edilmiştir (Şekil 1, 2, Tablo 3).



**Şekil 1.** Karbapenem duyarlı ve GSBL pozitif bir izolat



**Şekil 2.** MASTDISCS ID Carbapenem Detection Seti ile saptanan MBL pozitifliği



**Şekil 3.** *blaOXA-48* PCR sonuçları (M: 100 bp marker, EC61: pozitif kontrol (744 bp), izolatlar)

**Tablo 3.** Karbapenemaz şüpheli izolatların zon çapları (mm), GSBL ve karbapenemaz aktiviteleri

İzolat-No	IPM	ETP	MEM	GSBL	MASTDISCS ID	TEM	PCR
<i>E. coli</i> -1	27	21	26	Pozitif	-	Pozitif	bla <sub>OXA</sub>
<i>E. coli</i> -2	22	22	25	Negatif	-	Negatif	-
<i>E. coli</i> -3	24	27	26	Negatif	MBL +	Negatif	-
<i>E. coli</i> -4	23	27	26	Negatif	MBL +	Negatif	-
<i>E. coli</i> -5	9	0	7	Pozitif	-	Negatif	-
<i>E. coli</i> -6	24	24	26	Pozitif	MBL+	Negatif	-
<i>E. coli</i> -7	18	19	21	Pozitif	-	Pozitif	bla <sub>OXA-48</sub>
<i>K. pneumoniae</i> -1	26	14	22	Negatif	-	Negatif	-
<i>K. pneumoniae</i> -2	25	15	20	Pozitif	-	Pozitif	bla <sub>OXA</sub>
<i>K. pneumoniae</i> -3	16	0	0	Negatif	-	Pozitif	bla <sub>OXA-48</sub>

TEM: Temosilin diski

## TARTIŞMA

Antibiyotik direnç paternleri ve oranları her ülkede ve hatta farklı hastanelerde bile değişiklik gösterebilmektedir. Ülkemizde bu sonuçların değerlendirilmesi için, 2005 yılında tamamlanan HITIT-1 ve 2007 yılındaki HITIT-2 sürveyans çalışmaları yapılmıştır. Hastane kökenli izolatlarla yapılan bu çalışmalarda GSBL oranları sırasıyla *E.coli* için %26 ve %42, *K.pneumoniae* için %32 ve %41.4 olarak verilmiştir<sup>15,16</sup>. Doğu Avrupa'daki hastaneleri kapsayan çok merkezli MYSTIC sürveyans çalışmasında GSBL üreten bakterilerin belirgin bir şekilde artmakta olduğu; *E.coli* için Brezilya'daki GSBL oranının %19.6, Amerika Birleşik Devletleri'nde ise %5 oranında olduğu saptanmıştır<sup>17</sup>. Çalışmamızda kan örneklerinden izole edilen *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarındaki GSBL oranının (n:36/67, %53.7) ülkemizdeki diğer çalışmalara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu durum, izolatlarımızın çoğunun YBÜ, onkoloji ve hematoloji servislerinde yatan, uzun süre hastanede yatmayı gerektiren malignite gibi hastalıkları olan hasta örneklerinden elde edilmiş olması ile ilişkilendirilmiştir.

GSBL pozitif izolatlarda karbapenemler önemli bir tedavi seçeneğidir. Karbapenemaz aktivitesinin izlenmesi ve tedavinin doğru yönlendirilmesi, hem bu tür izolatların neden olduğu enfeksiyonlarda morbidite ve mortaliteyi

azaltmak hem de hastane enfeksiyonlarının kontrolüne katkı sağlamak açısından önemlidir. Ülkemizde karbapenemaz enzimlerinin birçoğu bildirilmiş olmakla birlikte; ilk kez 2001 yılında tanımlanan OXA-48 enzimi uzun yıllar ülkemize özgü bir enzim olarak belirtilmiş, ancak 2008 yılından itibaren birçok ülkede saptanmaya başlanmıştır<sup>18,19</sup>.

Ülkemizde daha önce yapılan bazı çalışmalarda GSBL oranları, karbapenemlere duyarlılık durumları ve karbapenemaz aktiviteleri bildirilmiştir. Güzel Tunçcan ve ark.<sup>20</sup>, hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilen 58 *E.coli*, 37 *Klebsiella* suşu olmak üzere toplam 95 izolat ile yaptıkları çalışmada; *E.coli* izolatlarının 22'sinde (% 38), *Klebsiella* izolatlarının ise 12'sinde (% 32) GSBL pozitifliği saptanmış ve izolatların hiçbirinde karbapenem direnci gözlenmemiştir. Görgeç ve ark.<sup>21</sup> kan kültürlerinden elde ettikleri GSBL pozitif Gram negatif bakterilerle yaptıkları çalışmada, 42'si *E. coli* ve yedisi *Klebsiella* spp. olmak üzere toplam 49 izolatla ertapenem ve meropenem diski kullanarak standart disk difüzyon yöntemi ve Modifiye Hodge Testi (MHT) ile karbapenemaz aktivitesi taramışlardır. Bu çalışmada, ertapenem için zon çapları 19-21 mm arasında olan üç izolatla MHT ile karbapenemaz aktivitesi saptanamadığı belirtilmiştir. Çakar ve ark.<sup>2</sup> EuSCAPE projesi kapsamındaki çok merkezli

çalışmalarında, toplam 155 karbapenemaz şüpheli *K.pneumoniae* (n= 134, % 86.5) ve *E.coli* (n=21, %13.5) izolatının 127' sinde OXA-48 geni, 15' inde ise MBL pozitifliği saptanmış ve izolatların her üç karbapenem (imipenem, meropenem, ertapenem) de dirençli olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca izolatların hiçbirinde KPC enzimi tespit edilememiştir.

Fenotipik değerlendirme yöntemlerinden biri olan MASTDISCS ID inhibitör kombinasyon diskleri ile yapılan bir çalışmada duyarlılık ve özgüllüğün sırasıyla karbapenemaz üreten izolatlarda %78 ve %93, NDM üreten izolatlarda %100 ve %100 olduğu; ancak, VIM ve IPM üreten izolatların yalnızca %50' sinin saptanabildiği ileri sürülmüştür. Ayrıca MASTDISCS ID ve Rosco Diagnostica Neo-Sensitabs disklerinin *Enterobacteriaceae* türlerinde VIM, IPM ve OXA-48 benzeri karbapenemazları belirlemede spesifik olmadığını belirtmişlerdir<sup>22</sup>. Çünkü MASTDISCS ID ile MBL ve KPC enzimleri belirlenebilmekte, ancak kit içeriğinde bulunmayan temosilin diski ek olarak test edildiğinde OXA-48 enzimi saptanabilmektedir.

Günümüzde Uzakdoğu ülkelerinde farklı bölgelerde tespit edilmeye başlanan NDM enzimi içeren izolatların artışı ciddi bir sorun olarak ortaya çıkmaktadır<sup>23</sup>. Ülkemizde 2011 yılında bir *K. pneumoniae* izolatında ilk defa NDM enzimi saptanmıştır<sup>24</sup>. 2015 yılında ülkemizde ilk kez OXA-48 ve NDM enzimi içeren izolat tespit edilmiştir<sup>25</sup>. Tekintaş ve arkadaşları<sup>26</sup> *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz enzimi saptamak amacıyla yaptıkları bir çalışmada; PCR ve fenotipik yöntemleri (MASTDISCS ID ve Carbapenem Inactivation Method (CIM))

karşılaştırmışlardır. Toplam 54 izolatın 33' ünde OXA-48, ikisinde NDM ve 19' unda her iki geninde birlikte bulunduğunu saptamışlardır.

Çalışmamızda, karbapenemaz şüpheli 10 izolatın üçünde MASTDISCS ID ile MBL pozitifliği saptanmış ancak bu bulgu moleküler yöntem ile doğrulanamamıştır (Tablo 3). Moleküler yöntem ile belirlenen OXA pozitif izolatlar ise MASTDISCS ID ile karbapenemaz negatif olarak belirlenmiştir. Ayrıca dört izolatta (*E. coli-1*, *E. coli-7*, *K. pneumoniae-2*, *K. pneumoniae-3*) ise, temosilin diski ile OXA-48 varlığı belirlenmiş ve PCR yöntemi ile uyumlu olduğu görülmüştür. PCR yöntemi ile iki izolatta OXA-48 geni pozitifken (*E. coli-7* ve *K. pneumoniae-3*), diğer iki izolatta *bla<sub>OXA</sub>* geninin tipi tespit edilememiştir. Çalışılan primerlerle (*bla<sub>OXA-23,48,51</sub>*) dört izolatın ikisinde OXA tipinin belirlenememesi bu iki izolatın farklı tipte (OXA-27, OXA-49, OXA-64, OXA-66 vb.) olabileceğini düşündürmektedir. PCR ile *bla<sub>OXA</sub>* pozitif izolatların hepsinde (4/4) CLSI'nin önerdiği gibi ertapenem zon çapı 22 mm' nin altında ve EUCAST'ın önerdiği gibi meropenem inhibisyon zonu <28 mm' dir (Tablo 3). Bir çalışmada karbapenemaz çalışması için ertapenem ve meropenem zon çaplarının birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir. Aynı çalışmada sadece imipenem veya meropenem kullanılan laboratuvarlarda rutin duyarlılık testlerinde karbapenemaz enzimlerinin saptanamayabileceği belirtilmiştir<sup>27</sup>. İzolat sayımız az olmakla birlikte bizim bulgularımız da bu bilgiyi desteklemektedir.

Sonuç olarak, hastanemizde 2013-2016 yılları arasında kan kültürlerinden elde edilen izolatlarda saptadığımız GSBL oranımız yüksektir. Çalışmamızda karbapenemaz

aktivitesini araştırmak için herhangi bir karbapenem için zon çapı <28 mm kabul edildiğinde şüpheli 10 izolatın üçünde MASTDISCS ID ile MBL saptanmış ancak bu sonuç moleküler yöntemlerle doğrulanamamıştır. Bu veriler doğrultusunda indikatör olarak ertapenem  $\leq 22$  mm alınmasının yalancı pozitif MBL sonuçlarını önleyebileceği söylenebilir. Ayrıca farklı sonuçlar disklerin duyarlılığının düşük olmasından kaynaklanabileceği gibi MBL geni için farklı primer çiftlerinin kullanılarak tekrarlanması gerektiğini de düşündürmektedir. PCR ile OXA geni saptanan izolatların tümünde ertapenem inhibisyon zonu  $\leq 22$  mm iken (CLSI önerisi), dört izolattan üçünde meropenem inhibisyon zonu <28 mm (EUCAST önerisi) dir. Moleküler yöntemler ile karbapenemaz araştırılırken CLSI veya EUCAST kriterlerinin hangisinin dikkate alınacağını saptamak amacıyla daha fazla sayıda izolat ile çalışılmalıdır. Moleküler yöntemlerle çalışma olasılığı kısıtlı olan mikrobiyoloji laboratuvarlarında, rutinde karbapenemaz varlığı ve türünün belirlenmesi için MASTDISCS ID kullanılabilir. Ancak temosilin diski eklenmediği takdirde ülkemizde yaygın olan karbapenemaz olan OXA-48'in saptanamayacağı bilinmelidir.

**Teşekkür:** Moleküler çalışmanın gerçekleştirildiği, Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Faruk Aydın ve Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı sorumlusu Doç. Dr. Kurtuluş Buruk'a teşekkür ederiz.

#### Kaynaklar

1. Swaminathan M, Sharma S, Poliansky Blash S, Patel G, Banach DB, Phillips M, et al. Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem resistant

Enterobacteriaceae in the setting of endemicity. Infect Control Hosp Epidemiol 2013;34(8):809-8.

2. Çakar A, Akyön Y, Gür D Karatuna O, Öğünç D, Özhak Baysan B, ve ark. Türkiye'de 2014 yılı İçinde izole edilen karbapeneme dirençli Escherichia coli ve Klebsiella pneumoniae izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul 2016;50(1):21-33.
3. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. Clin Microbiol Infect 2012;18(5): 413-31.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fifth Informational Supplement. M100-S25. Wayne PA: CLSI 2015.
5. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.0 2017. (<http://www.eucast.org>).
6. Centers for Disease Control and Prevention. Multiplex real-time PCR detection of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1). 2011 [<https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/kpc-ndm-protocol-2011.pdf>]. (Eriřim tarihi: 25.07.2017)
7. Hindiyeh M, Smollen G, Grossman Z, Ram D, Davidson Y, Mileguir F, et al. Rapid Detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. J Clin Microbiol 2008(Sept);2879-83.
8. Weldhagen GF, Prinsloo A. Molecular detection of GES-2 extended spectrum Betalactamase producing Pseudomonas aeruginosa in Pretoria, South Africa. Int J Antimicrob Agents. 2004; 24:35-8.
9. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M, et al. Detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. J Microbiol Methods 2010;83(2):185-7.
10. Saenz Y, Brinas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, et al. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant Escherichia coli strains of human, animal, and food origins. Antimicrob Agents Chemother 2004;48 (10):3996-1.
11. Hofko M, Mischnik A, Kaase M, Zimmermann S, Dalpke AH. Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max System. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1701-4.

12. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol* 2006;44(8):2974-6.
13. Poirela L, Walsh TR, Cuvilliera V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70:119-23.
14. Hong SS, Kim K, Huh JH, Jung B, Kang MS, Hong SG. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding class a carbapenemases. *Ann Lab Med.* 2012; 32:359-61.
15. Gür D, Gülay Z, Akan OA, Aktaş Z, Bal Kayacan Ç, Çakıcı Ö. ve ark. Türkiye'de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli Hitit sürveyansının sonuçları. *Mikrobiyol Bul* 2008; 42(4):537-44.
16. Gür D, Haşçelik G, Aydın N, Telli M, Gültekin M, Oğulnç D, et al. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 surveillance study of 2007. *J Chemother* 2009;21(4):383-9.
17. Pfaller MA, Jones RN. MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from the Americas: resistance implications in the treatment of serious infections. MYSTIC Study Group (Americas). *J Antimicrob Chemother* 2000; 46(Suppl T2):25-37.
18. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48(1):15-22.
19. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31). pii: 20549.
20. Güzel Tunçcan Ö, Tozlu Ketten D, Dizbay M, Hızal K. Hastane kaynaklı *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşlarının ertapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılığı. *ANKEM Derg* 2008;22(4):188-92.
21. Görgeç S, Kuzucu Ç, Yetkin F, Ersoy Y. Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten gram negatif bakterilerde tigesiklin ve diğer antimikrobiallerin in vitro etkinliği ve karbapenemaz aktivitesinin araştırılması. *İnönü Üniv Tıp Fak Derg* 2011;18(2):106-10.
22. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50:3877-80.
23. Bush K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr Opin Microbiol.* 2010; 13(5): 558-64.
24. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoğlu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56(5): 2784-5.
25. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015;35(3):382-3.
26. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir SS, Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyol Bul* 2017; 51(3):269-76.
27. Lomaestro BM, Tobin EH, Shang W, Gootz T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* 2006;43(3):26-8.