



Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvaradan Kliniğe Karbapenemazlar

Carbapenemases from the Laboratory to the Clinic in Gram-Negative Enteric Bacteria

Sinem BUDAK¹, Zerrin AKTAŞ², Hakan ERDEM³

¹ Ağrı Asker Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Ağrı, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Kasımpaşa Asker Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Servisi, İstanbul, Türkiye

ÖZET

Gram-negatif bakterilerde beta-laktamaz aracılı antimikrobiyal direnç özellikle sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların tedavisinde büyük sorun oluşturmaktadır. Beta-laktamaz aracılı enzimatik direnç mekanizmaları çoğunlukla plazmidler aracılığıyla aktarılmaktadır, bu nedenle bu suşların neden olduğu enfeksiyonlarda çoklu ilaç direnci nedeniyle tedavide problemler gözlenmektedir. Sonuçta, bu mikroorganizmaların neden olduğu, hayatı tehdit eden ciddi hastane enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenemler halen en güvenilir sınıf antibiyotiklerdir. Bu makalede *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında ortaya çıkan karbapenemaz aracılı karbapenem direncinin klinik önemi ve laboratuvar uygulamalarıyla tespit edilebilirliği irdelenmektedir.

Anahtar kelimeler: Karbapenem direnci, karbapenemaz, enterik bakteriler

Geliş Tarihi: 06.12.2011 • **Kabul Ediliş Tarihi:** 22.02.2012 • **Yayınlanma Tarihi:** 29.03.2012

ABSTRACT

In gram-negative bacteria, antimicrobial resistance related to beta-lactamases is a serious problem in the management of health-care-related infections. Enzymatic resistance due to beta-lactamases is mostly transferred via plasmids, which results in multiple drug resistance and difficulties in the treatment. Carbapenems are the most reliable group of antimicrobials in the treatment of infections caused by these resistant bacteria. In this report, we aimed to reveal the antimicrobial resistance-related carbapenemase-mediated resistance to carbapenems, the clinical significance, and the detectability of the resistance in the laboratory.

Key words: Carbapenem resistance, carbapenemases, enteric bacteria

Received: 06.12.2011 • **Accepted:** 22.02.2012 • **Published:** 29.03.2012

Son yıllarda enterik gram-negatif bakteriler (EGNB) sürekli değişen, ivmelenen direnç biçimleri göstermekte ve küreselleşen dünyada bu direnç biçimleri hızla yayılmaktadır. Hasta bakımının gelişmesi, yaşamı destekleyici tedavilere ve invaziv girişimlere giderek daha sık başvurulması, antibiyotik direncinin yayılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle EGNB'lerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi klinisyenler için önemli bir uğraş haline gelmiş, bu konu üzerine yapılan araştırma ve çalışmalar hız kazanmıştır. Sonuçta, direnç mekanizmalarının ve türlerinin giderek çeşitlilik kazanması, hızla yayılması ve bu direnç tiplerinin farklı bakteriler arasında aktarımı, elimizdeki tedavi seçeneklerini aşamalı olarak devre dışı bırakmaktadır.

Karbapenemler beta-laktam sınıfı içerisinde en geniş spektruma sahip, hızlı bakterisidal etki gösteren antibiyotiklerdir. Bu grup antibiyotiklerin sınıflaması Tablo 1'de verilmektedir. Birinci grup karbapenemler olan ertapenem ve panipenem özellikle toplumdan kazanılmış ciddi enfeksiyonların tedavisinde, ikinci grup karbapenemler ise güçlü nonfermantatif etkinlikleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Üçüncü grup karbapenem olan CS-023 ise ikinci grubun etkinliğine ek olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a karşı da aktivite göstermektedir^[1].

Bu ilaçların bakterilerde enzimatik dirençte rol oynayan AmpC ve geniş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) da dahil olmak üzere neredeyse hiçbir beta-laktamazdan etkilenmedikleri bilinmektedir^[1-5]. Karbapenemler penisilin bağlayan proteinlere (PBP) güçlü bir şekilde bağlanır. Genel yapı ve büyüklükleri nedeniyle porin kanallarından sızmaları ve bakteri hücrelerine geçişleri çok iyidir^[5,6]. Sonuçta, geniş antibakteriyel spektrumlarıyla aerob ve anaerob birçok mikroorganizma tarafından oluşturulan enfeksiyonlarda yaygın

kullanılmaktadır^[3,4]. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde, özellikle karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları son yıllarda dünyanın birçok bölgesinde sıklıkla izole edilmektedir. Bu izolatların neredeyse tüm antimikrobiyal ajanlara dirençli olup, hastanelerde epidemilere yol açtıkları bildirilmektedir^[7]. Karbapeneme dirençli EGNB'lerin neden olduğu bu enfeksiyonlar, hastanede yatış süresinin uzamasına, kritik hastalık ve invaziv alet varlığında yüksek mortalite ve morbiditeye neden olmaktadır^[8,9].

KARBAPENEM ve KARBAPENEMAZLARIN SINIFLANDIRILMASI

Karbapenemlere yönelik direnç gelişimi, değişen derecede hidroliz kapasitesine sahip karbapenemaz üretimiyle sınırlı değildir^[7]. Bu antibiyotiklere karşı bazı mikroorganizmalar intrinsek direnç gösterebilir. Örneğin; karbapenemlerin MRSA'nın PBP-2a reseptörlerine zayıf bağlanması, bu bakterilerdeki intrinsek dirençten sorumludur^[3]. Bazı suşlarda, atım pompalarıyla oluşan dirence ya da membran geçirgenliğinde azalmaya, GSBL ya da AmpC enzimlerinin aşırı üretiminin eşlik etmesiyle de karbapenem direnci oluşabilir^[1,10-15]. Özellikle CTX-M tipi GSBL'lerin EGNB'lerde yayılmasının karbapenem direnci gelişmesini kolaylaştırdığı bildirilmektedir^[16].

İlk belirlenen karbapenemazlar EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic acid) tarafından inhibe oldukları için metalloenzimler olarak adlandırılmıştır. Ancak, 1980'li yılların sonunda karbapenemleri hidrolize eden, EDTA ile inhibe olmayan enzimler saptanmıştır^[17]. Karbapenemazların sayısı ve çeşitliliğindeki bu artışla beraber sınıflandırılma ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Beta-laktamazlar ilk olarak enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine dayanan moleküler gruplarına göre sınıflandırılmıştır. Buna göre Ambler sınıflaması oluşturulmuş ve beta-laktamazlar dört moleküler sınıfa ayrılmıştır^[18]:

1. Sınıf A: Penisilinazlar,
2. Sınıf B: Metalloenzimler,
3. Sınıf C: Sefalosporinazlar veya AmpC,
4. Sınıf D: Oksasilinazlar.

Sınıf A, C ve D enzimler aktif bölgelerinde serin, Sınıf B ise aktif bölgesinde çinko içermektedir. Sınıf A, B ve D daha çok plazmid, sınıf C sefalosporinazlar ise çoğunlukla kromozom kontrolünde olan enzimlerdir.

Tablo 1. Karbapenemlerin aktivitelerine göre sınıflandırılması*

Grup 1	Grup 2	Grup 3
Ertapenem	İmipenem	CS-023
Panipenem	Meropenem	
Nonfermantatif etkinlik sınırlı	Biapenem	
	Doripenem	

* 1 no'lu kaynaktan alınmıştır.

Tablo 2. Substrat ve inhibisyon profiline göre karbapenemazlar

Moleküler sınıf	Fonksiyonel grup	Enzim	Hidroliz profili					Inhibisyon profili	
			Penisilin	BKS	GSS	Aztreonam	Karbapenem	EDTA	Klavulanik asit
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	±
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
		NDM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

BKS: Birinci kuşak sefalosporinler, GSS: Geniş spektrumlu sefalosporinler, EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit.

Moleküler sınıflamanın yanı sıra enzimler substrat spesifisiteslerine göre fonksiyonel olarak sınıflandırılmıştır. Karbapenemazları içeren fonksiyonel sınıflama şemaları ilk olarak Bush tarafından 1988 yılında ortaya konmuştur. Bu enzimler günümüzde, yapısal özellikleri, çinko afiniteleri ve hidroliz karakterlerinin kombinasyonu temel alınarak üç sınıfta toplanmıştır^[19,20]. Bu fonksiyonel sınıflamada karbapenemazlar grup 2d, 2f ve 3 içerisinde, moleküler sınıflamada ise sınıf A, B ve D içerisinde yer almaktadır (Tablo 2).

Sınıf A karbapenemazlar, tüm beta-laktamları hidrolize eder. Sefoksitin ve seftazidim için zayıf, fakat belirlenebilir bir hidroliz söz konusudur. GSBL'ler ile karıştırılabilir. Her iki grupta geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder. Farkı karbapenem hidroliz aktivitesi ve bu aktivitenin klavulanik asit ve tazobaktam tarafından sadece zayıf inhibisyon göstermesidir^[11,21-23].

Sınıf B metallobeta-laktamazların hidroliz mekanizması ise, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonu ile beta-laktamların etkileşmesi üzerinedir. Dolayısıyla, bunlar çinko bağlayıcı olan EDTA ve diğer divalent katyonlarla inhibe olur. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilmez^[17,24-26]. Karbapenem hidroliz aktiviteleri diğer grup karbapenemazlara göre daha

fazla ve karbapenemler için oluşturdukları minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri daha yüksektir.

Sınıf D karbapenemazlar, çoğunlukla *Pseudomonas aeruginosa* ve asinetobakter türlerinde, daha az sıklıkla da EGNB'lerde bulunmaktadır. Ancak, ülkemizde özellikle OXA-48 aracılığıyla enterobakterilerde oluşan karbapenem direnci son yıllarda artan oranda bildirilmektedir^[27-30]. OXA 23-27-49 (grup 1), OXA 24-25-26-40-72 (grup 2), OXA-51 (grup 3), OXA-58 (grup 4) asinetobakter türlerinde karbapenem direnci ile ilişkili iken, OXA-48 (grup 5) *Escherichia coli*, klebsiella ve sitrobakter türlerinde karbapenem direncine neden olmaktadır^[30-32]. Bu enzimler oksasilini klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmeleri nedeniyle oksasilinazlar olarak tanımlanmıştır. Klavulanik asit ve EDTA ile zayıf bir inhibisyon gösterir. Genel olarak oksasilinazlar, seftazidim, seftaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmez ya da zayıf bir şekilde hidrolize eder^[27,29,30]. OXA tip karbapenemazların çoğu imipenem ve özellikle meropeneme karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterir.

EPİDEMİYOLOJİ

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa'dan yapılan bildirimlerden EGNB'lerde metallobeta-lakta-

maz ve *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) aracılı karbapenem direncinin oldukça büyük sorun oluşturduğu anlaşılmaktadır^[2,17,33-35]. KPC ailesinin ilk üyesi ICARE (Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology) surveyans çalışmasında ABD'nin Kuzey Karolina eyaletinde bir *K. pneumoniae* suşunda 1996 yılında elde edilmiştir. KPC beta-laktamazlar çoğunlukla *K. pneumoniae*'da bulunsa da *E. coli*, enterobakter ve salmonella türlerinde de saptandığı bildirilmektedir. Metallobeta-laktamaz enzimler ise sıklıkla nonfermantatiflerde bulunmakla birlikte, enterik bakterilerde de bildirilmektedir. En sık görülen metallobeta-laktamazlar VIM, IMP, SIM ve GIM enzim aileleridir. Transfer edilebilir imipenem direnci (IMP) ise ilk olarak 1990 yılında bir *P. aeruginosa* suşunda ve ardından *Bacillus fragilis* izolatında bildirilmiştir. VIM ve IMP dünya çapında en sık belirlenen metallobeta-laktamaz ailesi üyeleridir^[17].

"National Healthcare Safety Network"un 2008 yılı verilerine göre karbapenem direnci *E. coli* suşları için %0.9-4, *K. pneumoniae* suşları için %3.6-10.8, *Klebsiella oxytoca* için %0-5 arasında bildirilmiştir^[36]. Avrupa'da Yunanistan ve İtalya gibi özellikle sınıf A KPC aracılı karbapenem direncinin yüksek olduğu ve hastane epidemilerinin belirlendiği ülkeler dışında, EARRS verilerine göre karbapenem direnci *E. coli* suşları için %0, *Klebsiella* spp. suşları için %0.6 olarak belirtilmiştir^[37].

Son birkaç yıl öncesine kadar EGNB karbapenemazlarına hak ettikleri ilginin gösterilmediği söylenebilir. Ancak 2010 yılında NDM-1 (New Delhi Metallobeta-laktamases) tipi direnç *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında kıtalar arası yayılım göstererek epidemiyi oluşturmuştur^[38]. NDM-1 tipi direnç bir plazmid üzerinde yerleşmiştir ve karbapenemlere %90'ın üzerinde direnç gösterebilir. *E. coli* ve *Klebsiella* türleri dışında *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* ve *Enterobacter cloacae* gibi enterobakterilerin diğer üyeleri arasında da bildirilmiştir^[38,39]. KPC ve OXA-48 ile ilişkili direnç biçimlerinin aksine NDM-1 üreten EGNB suşlarının karbapenemler için yüksek MİK değerleri bildirilmiştir. Hindistan'da bazı suşlarda tigesiklin ve kolistin direnci ile tüm antibiyotiklere dirençli suşlar da tanımlanmıştır^[28]. Ayrıca, epidemiyi başlangıcından itibaren duyarlılık durumunu ortaya koymak amacıyla yapılan çalışmalarda üç farklı bölgeden (İngiltere, Güney Hindistan, Kuzey Hindistan) izole edilen suşlarda tigesiklin için %56-67, kolistin için %89-100 arasında değişen duyarlılık bildirilmiştir^[38].

NDM-1 en sık *K. pneumoniae* suşlarında saptanırken, diğer EGNB ailesi üyeleri arasında da giderek yayılmaktadır. İngiltere'de NDM-1 tanımlanmış suşların tümünün *E. coli* olmasına rağmen "Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)" profilinin, Hindistan'dan izole edilen *K. pneumoniae* suşlarına benzer olduğu saptanmıştır. PFGE sonuçları ile tek bir profilin üyesi olmaları klonal yayılımın varlığını ileri sürmektedir^[28,38]. Bu plazmidler aracılığıyla aktarılabilen karbapenemaz direnç mekanizmalarının uluslararası yayılım nedeniyle ciddi bir tehdit oluşturabileceğini bize göstermiştir.

Ülkemiz için ise EGNB'lerde henüz KPC ve NDM karbapenemaz direnci bildirilmemiştir. Ancak, özellikle hastane enfeksiyonu etkeni olan EGNB ailesi üyeleri arasında sınıf D OXA karbapenemaz aracılı karbapenem direnci nadir değildir. Çok merkezli karbapenem direncinin araştırıldığı çeşitli çalışmalar olmakla beraber direnç mekanizmalarına yönelik moleküler çalışmalar sınırlıdır^[40,41]. Yapılan bazı bölgesel çalışmalarda ise karbapenem direnci ile ilişkili OXA-48 karbapenemaz aktivitesi EGNB izolatlarında gösterilmiştir^[27,29].

Ülkemizde 2000-2003 yılları arasında dokuz merkezin katıldığı MYSTIC çalışmasının sonuçlarına göre EGNB'lerin genel olarak meropenem %99.3, imipenem %97.6 duyarlılık gösterdiği bildirilmiştir^[41]. Yine, 2007 yılında yapılan çok merkezli HİTİT-2 çalışmasının sonuçlarına göre *E. coli* suşlarında karbapenem direnci gözlenmezken, *K. pneumoniae* suşlarında imipenem direnci %3.2 olarak belirlenmiştir^[40]. EARRS-2008 çalışması ise Türkiye'de karbapenem direncinin %1-5 arasında olduğunu bildirmiştir^[37]. Türkiye'de 2000 yılından sonra yayınlanan toplum kökenli EGNB izolatlarını irdeleyen bir derlemede ise imipenem direnci *E. coli* suşlarında %0-3 aralığında (ortanca değer %1), *Klebsiella* suşlarında ise %0-5 aralığında (ortanca değer %0) olarak bildirilmiştir^[42].

KARBAPENEMAZ AKTİVİTESİNİN SAPTANMASI

Karbapenemaz üreten EGNB ailesi üyelerinin hızlı ve doğru tespiti, uygun antimikrobiyal tedavi seçimi enfeksiyon kontrol önlemleri için çok önemlidir^[7,43]. Bazı direnç genlerini taşıyan suşlarda karbapenem MİK değerleri dirençli kabul edilen sınırın altında olabilir. Bu nedenle, karbapenem duyarlılığında azalmanın belirlenmesi karbapenem direncinin tespitinde klinik

olarak önemlidir^[5,7,23,33,34,44]. "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" 2010 yılında EGNB için yeni MİK ve disk difüzyon eşiklerini yayınlamıştır^[45]. Bu yeni eşikler MİK için ortalama 1-2 dilüsyon daha düşüktür. Öte yandan yeni disk difüzyon çapları da eski rehberden daha geniş olarak belirlenmiştir. Dolayısıyla, bu yeni rehberde göre eskiden duyarlı olan pek çok suş orta düzey veya tam dirençli tanımlanmaktadır. Dolayısıyla, bu yeni eşikler tedavi kararlarının verilebilmesi için karbapenemaz araştırılma gereksinimi aslında oldukça azaltmışlardır.

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların karbapenem MİK değerleri karbapenemaz enzim tipine, düzeyine ve bakterinin türüne göre değişiklik gösterebilir. Ayrıca, GSBL ve AmpC gibi beta-laktamazların üretimi, azalmış permeabilite ve atım pompası gibi diğer direnç mekanizmalarının varlığına bağlı olarak çeşitlilik gösterebilir^[1,7,12,43,44,46].

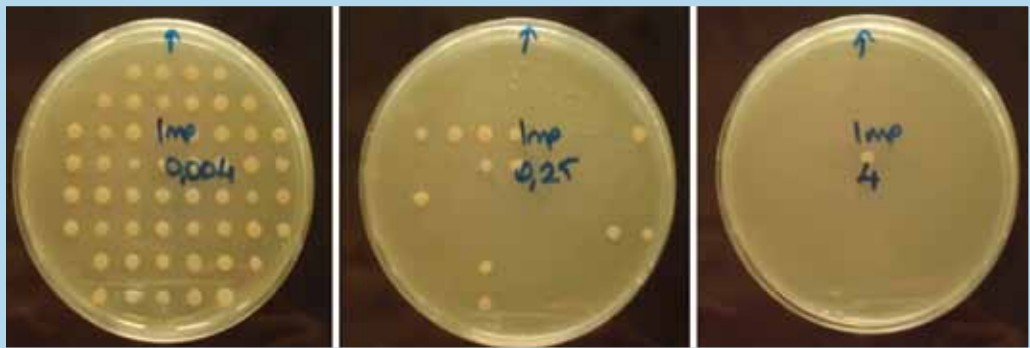
Karbapeneme dirençli suşların tespitinde broth mikrodilüsyon ve agar dilüsyon yöntemleri, disk difüzyon, E-test ve otomatize yöntemlerden çok daha yüksek duyarlılık göstermektedir. İmipenem, meropenem, ertapenem için antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, E-test ve otomatize sistemlerin karşılaştırıldığı bir çalışmada en duyarlı sonuçların %94-97 oranında dilüsyon yöntemleriyle elde edildiği bildirilmiştir. E-test %58-90, otomatize sistemler ise %48-98 oranında duyarlı olarak değerlendirilmiştir. Ancak, otomatize sistemlerin duyarlılığı yine çalışılan yöntemlere göre değişiklik göstermiştir^[7,33]. Resim 1'de agar dilüsyon testi ile MİK düzeyinin tespiti sunulmuştur.

Testin duyarlılığı ayrıca hangi karbapenem molekülü ile test edildiğine göre değişmektedir. Karbapenemaz aktivitesinin belirlenmesinde değişik karbapenem moleküllerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada meropenemin daha özgün, ancak ertapenemin daha duyarlı olduğu belirtilmiştir. Ertapenemin herhangi bir test tarafından duyarlı bulunmaması, imipenem ve meropeneme göre daha duyarlı bir göstergedir^[7]. Öte yandan ertapenem, imipenem ve meropenemden daha düşük özgüllüğe sahiptir. Çünkü AmpC ve GSBL gibi diğer beta-laktamazların üretimi ve azalmış permeabilite imipenem ve meropenemden daha çok ertapenem MİK değerlerini değiştirir^[3,33,47]. *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında in vitro karbapenemaz aktivitelerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, GSBL pozitif suşlarda imipenem, meropenem ve doripenem için MİK₉₀ değerlerinde iki kat titre artışı, ertapenem için MİK₉₀ değerinde üç kat dilüsyon artışı izlenmiştir^[3]. Karbapenemaz üretiminin çoğunlukla düşük düzeyde olması nedeniyle suşların %60 kadarında meropenem ve imipenem için MİK değerleri duyarlı sınırlar arasında yer almaktadır. Bu nedenle karbapenemaz aktivitesinin fenotipik olarak belirlenmesinde tarama amacıyla ertapenem kullanılması önerilmektedir^[47].

Özellikle yoğun bakım ünitelerinde birden fazla risk faktörü taşıyan hastaların hayatı tehdit eden enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem kullanımı zorunlu ise MİK değerlerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır. CLSI ölçütlerine göre, EGNB'lerde MİK değerleri ertapenem için $\geq 0.5 \mu\text{g/mL}$ ve diğer karbapenemler için $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ olarak elde edilen suşların karbapenemaz aktivitesi açısından araştırılması önerilmektedir^[45].

Resim 1.

Agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerlerinin belirlenmesi.



Modifiye Hodge Testi

Karbapenemaz aktivitesini gösteren uygulanması kolay fenotipik yöntemlerden birisi Modifiye Hodge testi (MHT)'dir. Bu test CLSI tarafından en az bir geniş spektrumlu sefalosporin alt grubundaki antibiyotiklerden birine direnç (örn. sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim ve seftriakson) veya karbapenem MİK değerlerinde yükselme ve inhibisyon zon çaplarında azalma olması durumunda önerilmekteydi. Son güncelleme ile karbapenem inhibisyon zon çapları ve MİK değerlerinin belirlenmesi yeterli kabul edilmektedir^[45]. Ancak rutin olarak dilüsyon yöntemlerinin çalışmadığı laboratuvarlarda KPC, OXA ve MBL gibi enzimlerin hepsini birden tespit edebilmesi ve uygulanması kolay bir test olması nedeniyle kullanışlı bir yöntem olarak öne çıkmaktadır^[7,15,33].

Test için 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Mueller Hinton buyyonda seyreltildikten sonra Mueller Hinton Agar (MHA) plağına ekilir. Ertapenem, imipenem veya meropenem disklerinden biri plak merkezine yerleştirilir. 10 µL'lik bir öze veya eküvyon ile 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterisi alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20-25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekilir ve plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilir. MHA plağında, test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışına bakılır. Üremede artış varlığı karbapenemaz üretimi pozitif olarak değerlendirilir^[45]. Resim 2'de karbapenemaz üreten bir bakteriyeye ait MHT sunulmaktadır.

Resim 2.

Pozitif Modifiye Hodge testi.



MHT CLSI kılavuzuna göre %95-100 oranında duyarlıdır. Fakat kişiselleşebilecek bir yöntem olması testi yorumlarken güçlükler neden olabilir. Ayrıca KPC, MBL ve OXA enzimlerinin ayırımını ortaya koymaması nedeniyle epidemiyolojik olarak kullanışlı bir test değildir ve özgüllüğü düşüktür. GSBL ya da AmpC üreten suşlarla azalmış ya da kaybolmuş porin salınımı yalancı pozitif sonuçlara neden olabilir^[7,43]. Bir çalışmada GSBL pozitif Outer Membran Protein (Omp) kaybı belirlenen 18 suşun 10'unda ve KPC üreten bütün suşlarda MHT pozitif saptandığı, bu nedenle suşların ayırımında zayıf özgüllük gösterdiği bildirilmiştir^[47]. Güncel bir çalışmada ise indikatör suş olarak *E. coli* ATCC 25922 yerine *K. pneumoniae* ATCC 700603 kullanılarak MHT sonuçlarının duyarlılığı ve özgüllüğü araştırılmıştır. *K. pneumoniae*'nin indikatör suş olarak kullanılmasıyla daha özgül (%97) ve daha duyarlı (%100) sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir^[48].

Kombine Disk Yöntemi

Karbapenemazlara özgün inhibitörlerin ilavesiyle karbapenemaz aktivitesinin in vitro olarak belirlenmesi tanıda yardımcı bir diğer yöntemdir. Sınıf A karbapenemazlar için boronik asit (3 aminofenil boronik asit), sınıf B metallobeta-laktamazlar için EDTA ya da dipikolinik asidin karbapenemaz aktivite inhibitörü olarak kullanılması birçok çalışmada önerilmiştir^[7,43]. Boronik asit fenotipik testinin KPC pozitif suşların belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu belirlenmiştir. Bununla beraber ticari, hazır elde edilebilir olmaması ve sonuçların açıklanması için bir güne daha ihtiyaç duyulması nedeniyle rutin olarak kullanılmamaktadır^[47].

EDTA ve boronik asit gibi karbapenemaz aktivite inhibitörlü kombine diskler ile karbapenemaz aktivitesini belirlemek için çeşitli çalışmalar farklı konsantrasyonlarda inhibitör önermektedir. Temelde test için 0.5 McFarland eşelinde standardize edilmiş bakteri süspansiyonundan MHA plağına ekilerek, inhibitör uygun çözücüsü içerisinde hazırlanır. Hazırlanan çözeltiden test edilmek istenen karbapenem disklerine ilave edilerek kombine diskler oluşturulur. On altı-on sekiz saatlik inkübasyondan sonra kombine olan karbapenem diski ile kombine olmayan disk inhibisyon zon çapları karşılaştırılır. İnhibisyon zon çaplarında 5 mm ve daha fazla artış olması karbapenemaz üretimi açısından anlamlı kabul edilir^[49-52].

Enterik bakterilerde EDTA kombine disk yöntemi, MBL E-test uygulaması, karbapenemlere düşük MİK

değerleri söz konusu ise yorumlamada güçlükler neden olabilir. Gram-negatif bakterilerde kombine disk yöntemi ve E-test uygulamasının karşılaştırıldığı bir çalışmada, kombine disk yöntemi %70, E-test %36 duyarlı bulunmuştur. Metallobeta-laktamaz aktivitesi fenotipik olarak pozitif saptanan suşlarda moleküler yöntemlerle metallobeta-laktamaz varlığı gösterilememiştir^[53]. Sadece MBL E-test, EDTA kombine disk yöntemi gibi fenotipik yöntemlerle metallobeta-laktamaz aktivitesi varlığının belirlenememekte, kesin olarak tanımlamak için moleküler yöntemlerle doğrulamak gerekmektedir^[33,49].

Enzim Ekstraksiyonu Uygulaması

Karbapenemaz aktivitesini belirlemede bir diğer fenotipik yöntem enzim ekstraksiyonu uygulamasıdır. Bakteriden sonikasyon yöntemiyle elde edilen enzim karbapenem diski üzerine eklenerek enzim içeren kombine diskler oluşturulur. 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları hazırlanan MHA agar plağına üzerine enzim içeren kombine karbapenem diski ve kombine olmayan karbapenem diski yerleştirilir. 35°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra enzim içeren diskin inhibisyon zon çapında içermeyen diskin inhibisyon zon çapına göre 2 mm ve daha fazla azalma olması karbapenemaz üretimi açısından anlamlı kabul edilir^[47].

Karbapenem direncinin araştırıldığı bir çalışmada, moleküler yöntemlerle karbapenemaz aktivitesi saptanmayan suşlarda imipenem MHT ile %9, meropenem MHT ile %6.9 oranında yalancı pozitiflik elde edildiği bildirilmiştir. Yalancı pozitiflik elde edilen suşlarda, bakteriden elde edilen enzim ekstraksiyonu uygulanması sonucunda tamamı negatif olarak değerlendirilmiştir. Enzim ekstraksiyonu uygulaması MHT'den daha az duyarlı olmakla birlikte, tanıda alternatif ve daha özgün olduğu düşünülen yardımcı yöntemlerden birisidir^[47].

Karbapenem direncinden şüphe edildiğinde çeşitli fenotipik yöntemler önerilmekle birlikte bu direncin karbapenemaz aracılı olup olmadığı her zaman ayırt edilemeyebilir. Eş zamanlı diğer direnç mekanizmalarıyla karbapenem MİK değerleri yükselebilir. Bu nedenle sadece fenotipik yöntemlerle karbapenemaz aktivitesi belirlenmeye çalışıldığında yalancı pozitif sonuçlar elde edilebilir^[3,47].

Genotipik doğrulama, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile karbapenem direnç genlerinin belirlenmesin-

den oluşur. Yeni varyantların artmış sayıları ile genlerin yüksek çeşitliliği nedeniyle, negatif genotipik sonuç alınan suşların da referans laboratuvarlarına gönderilerek ileri genotipik doğrulama yapılması önerilmektedir^[43].

KARBAPENEMAZLARIN KLİNİK ANLAMI

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların hem enfeksiyona hem de kolonizasyona neden olduğu çoktandır bilinmektedir^[54-56]. Hastane kaynaklı sporadik enfeksiyonlar kadar epidemilere de yol açmıştır^[56-58]. Bu mikroorganizmalar solunum yolu, abdominal sürüntü, kateter, apse, kan kültürü, idrar ve cerrahi yara örneklerinden izole edilmiştir^[54,56,59,60].

OXA karbapenemaz üretimi imipenem için *Acinetobacter baumannii* suşlarında yüksek düzey MİK değerlerine neden olurken (MİK > 8 µg/mL), bu enzimle EGNB'lerde karbapenem duyarlılığı yalnızca azalmıştır^[30]. Bu nedenle, özellikle klebsiella türlerinde, OXA karbapenemaz aracılığıyla oluşan karbapenem direncinde yüksek düzey MİK değerleri saptandıysa eşlik eden diğer direnç mekanizmalarının da varlığı akla getirilmelidir. Endimiani ve arkadaşları GSBL negatif, GSBL pozitif ve karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında farklı karbapenemler için MİK değerlerini araştırmışlardır^[47]. Bu çalışmada, karbapenem MİK değerlerinde GSBL pozitifliği ile gözlenen kısmi artış, karbapenemaz aktivitesi gösterenlerde çok daha fazla olmuş ve en yüksek MİK değerleri ertapenem için elde edilmiştir. Ülkemizden yapılan bir çalışmada, OXA-48 karbapenemaz aktivitesi tespit edilen *K. pneumoniae* suşlarında MİK değerleri meropenem için 64 µg/mL, imipenem için 128 µg/mL olarak belirlenirken, ertapenem için 256 µg/mL olarak saptanmıştır. Bu suşlarda beraberinde aminoglikozid, kinolon ve geniş spektrumlu sefalosporin direnci de saptanmıştır^[29]. Birden fazla direnç mekanizmasının varlığı, antibiyotik bakteriyel üzerindeki etkinliğini azaltır ve MİK değerlerini artırarak dirençli suşların seçilmesine neden olabilir. Eşlik eden aminoglikozid modifiye edici ve pompa atım sistemlerini düzenleyen enzimlerde oluşan mutasyonlar, porin defektleri, AmpC, GSBL ve kinolon direnci varlığı direnç gelişimi açısından önemlidir.

Enfeksiyon Kontrolü

Karbapenemaz üreten mikroorganizmalara yönelik enfeksiyon kontrol önlemleri tam olarak netleşmiş

değildir^[58,59,61]. Bu bakterilerle rektal kolonizasyon saptanmış ve bu nedenle rektal tarama önerilmiştir^[26,59,62]. Bu hastalar için izolasyon uygun olabilir^[63]. Bazı çalışmalarda kapsamlı enfeksiyon kontrol önlemleri alındığında bu mikroorganizmaların aktarılmasının önüne geçildiğinden söz edilmektedir^[64-66].

SONUÇ

Türkiye’de yurt dışı verilerle karşılaştırıldığında çok yüksek karbapenem direnci bildirilmemektedir. Aktarılabılır enzimatik direnç genleri aracılığıyla bu direnç biçimlerinin hızla yayılması, komşu ülkelerde oluşturduğu gibi hastane epidemilerine yol açması uzak bir olasılık değildir. Karbapenemazların EGNB’lerde yayılımı iki açıdan önem taşımaktadır. Birincisi, hastane kaynaklı EGNB izolatlarında giderek artan GSBL oranlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, karbapenemaz aktivitesi eş zamanlı çoklu ilaç direnç gelişimini de beraberinde taşıyarak yüksek mortalite ile seyreden enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle, özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi enfeksiyonlarda karbapenem duyarlılığını doğru ve mümkün olan en kısa sürede belirlemek etken bakterinin izole edildiği hasta için yaşamsal önem taşımaktadır. İkinci gerekçe ise doğru ve çabuk laboratuvar tanının enfeksiyon kontrolü için taşıdığı önemdir. Daha hızlı sonuçlar için fenotipik yöntemlere gereksinim olduğu kadar moleküler yöntemlere de gerek duyulduğu, hastane altyapılarında bu yöntemlere yer verilmesinin gerekliliği unutulmamalıdır.

KAYNAKLAR

1. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem* 2009; 16: 564-75. Epub 2009/02/10.
2. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, Brudney D, Sompolinsky D, Navon-Venezia S, Livermore DM. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1261-4. Epub 2008/09/25.
3. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007; 67: 1027-52. Epub 2007/05/10.
4. Shah PM. Parenteral carbapenems. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1): 175-80. Epub 2007/12/25.
5. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2006; 56: 367-72. Epub 2006/10/06.
6. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control* 2006; 34 (5 Suppl 1): S20-8; discussion S64-73. Epub 2006/07/04.
7. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clinical Microbiology Newsletter* 2009; 31: 55-62.
8. Fukigai S, Alba J, Kimura S, Iida T, Nishikura N, Ishii Y, Yamaguchi K. Nosocomial outbreak of genetically related IMP-1 beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Japan. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 306-10. Epub 2007/02/06.
9. Maltezou HC. Metallo-beta-lactamases in gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance? *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33: 405 e1-7. Epub 2008/12/20.
10. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis* 2005; 11: 260-4. Epub 2005/03/09.
11. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151-61. Epub 2001/03/21.
12. Bilavsky E, Schwaber MJ, Carmeli Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing enterobacteriaceae?: proactive versus reactive strategies. *Curr Opin Infect Dis* 2010; 23: 327-31. Epub 2010/06/29.
13. Gulmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31: 523-6. Epub 2008/03/15.
14. Crowley B, Benedi VJ, Domenech-Sanchez A. Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3679-82. Epub 2002/10/18.
15. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3881-9. Epub 2003/11/26.
16. Lartigue MF, Poirel L, Poyart C, Reglier-Poupet H, Nordmann P. Ertapenem resistance of *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2007; 13: 315-7. Epub 2007/05/08.

17. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58, table of contents. Epub 2007/07/17.
18. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289: 321-31. Epub 1980/05/16.
19. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-33. Epub 1995/06/01.
20. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76. Epub 2009/12/10.
21. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 711-4. Epub 2003/03/05.
22. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228-36. Epub 2009/03/28.
23. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 4423-4. Epub 2005/09/29.
24. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2: 501-12. Epub 2007/10/12.
25. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Canton R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frere JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 380-8. Epub 2007/01/16.
26. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25. Epub 2005/04/16.
27. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22. Epub 2003/12/25.
28. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36 (Suppl 3): S8-14. Epub 2010/12/07.
29. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008; 54: 101-6. Epub 2008/02/28.
30. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 373-83. Epub 2006/02/01.
31. Vahaboglu H, Budak F, Kasap M, Gacar G, Torol S, Karadenizli A, Kolayli F, Eroglu C. High prevalence of OXA-51-type class D beta-lactamases among ceftazidime-resistant clinical isolates of *Acinetobacter* spp.: co-existence with OXA-58 in multiple centres. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 537-42. Epub 2006/07/04.
32. Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. Acquired carbapenemases in gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112-22. Epub 2010/01/21.
33. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2723-5. Epub 2007/06/22.
34. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2066-9. Epub 2008/04/04.
35. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 1257-63. Epub 2008/01/30.
36. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, Fridkin SK. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 996-1011. Epub 2008/10/25.
37. European Antimicrobial Resistance Surveillance System, <http://www.hpsc.ie/hpsc/A-Z/MicrobiologyAntimicrobialResistance/EuropeanAntimicrobialResistanceSurveillanceSystemEARSS/>(accessed in February 2011).
38. Hsueh PR. New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae. *J Formos Med Assoc* 2010; 109: 685-7. Epub 2010/11/03.
39. Nataraj G. New Delhi metallo beta-lactamase: what is in a name? *J Postgrad Med* 2010; 56: 251-2. Epub 2010/10/12.
40. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogunc D, Arikan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F, Gulay Z, Sumerkan B, Esel D, Kayacan CB, Aktas Z, Soyletir G, Altinkanat G, Durupinar B, Darka O, Akgun Y, Yayla B, Gedikoglu S, Sinirtas M, Berktaş M, Yaman G. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother* 2009; 21: 383-9. Epub 2009/07/23.

41. Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; 59: 453-7. Epub 2007/09/25.
42. Coskun O, Erdem H, Avci A. Management of community-acquired acute bacterial cystitis in Turkey. *Turk J Med Sci* 2011; 41: 149-57.
43. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 205-10. Epub 2010/07/06.
44. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase-and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 570-3. Epub 2007/12/12.
45. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; update CLSI document M100-S20 June 2010 update Clinical and Laboratory Standards Institute.
46. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 3018-20. Epub 2005/06/28.
47. Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 4417-25. Epub 2010/10/01.
48. Pasteran F, Veliz O, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Sensitive and specific modified Hodge test for KPC and metallo-beta-lactamase detection in *Pseudomonas aeruginosa* by use of a novel indicator strain, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 4301-3. Epub 2011/10/21.
49. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1664-71. Epub 2010/06/15.
50. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 4083-6. Epub 2008/10/17.
51. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 362-7. Epub 2008/12/17.
52. Giske CG, Gezelius L, Samuelson O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenyl boronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 552-6. Epub 2010/07/06.
53. Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL. Comparison of the double-disk, combined disk, and E-test methods for detecting metallo-beta-lactamases in gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 5-11. Epub 2004/05/12.
54. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 3026-9. Epub 2007/06/15.
55. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB 3rd, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4438-40. Epub 2004/10/27.
56. Herbert S, Halvorsen DS, Leong T, Franklin C, Harrington G, Spelman D. Large outbreak of infection and colonization with gram-negative pathogens carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 at a 320-bed tertiary hospital in Australia. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2007; 28: 98-101. Epub 2007/01/19.
57. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 1549-56. Epub 2005/11/04.
58. Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castaneda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo-beta-lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5094-101. Epub 2004/11/06.
59. Hiramata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R, Matsuda J, Nakano M, Tomono K, Maesaki S, Kaku M, Yamada Y, Kamihira S, Kohno S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 2006-11. Epub 1998/08/04.
60. Souli M, Kontopidou FV, Papadomichelakis E, Galani I, Armaganidis A, Giamarellou H. Clinical experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 847-54. Epub 2008/02/14.

61. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities. *MMWR* 2009; 58: 256-60. Epub 2009/03/21.
62. Aubron C, Poirel L, Fortineau N, Nicolas P, Collet L, Nordmann P. Nosocomial spread of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the metallo-beta-lactamase VIM-2 in a hematology unit of a French hospital. *Microb Drug Resist* 2005; 11: 254-9. Epub 2005/10/06.
63. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2880-2. Epub 2006/07/28.
64. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G, Landman D, Bratu S, Augenbraun M, Quale J. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2009; 30: 447-52. Epub 2009/03/24.
65. Munoz-Price LS, Hayden MK, Lolans K, Won S, Calvert K, Lin M, Stemer A, Weinstein RA. Successful control of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* at a long-term acute care hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 341-7. Epub 2010/02/24.
66. Ben-David D, Maor Y, Keller N, Regev-Yochay G, Tal I, Shachar D, Zlotkin A, Smollan G, Rahav G. Potential role of active surveillance in the control of a hospital-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31: 620-6. Epub 2010/04/08.

Yazışma Adresi /Address for Correspondence

Uzm. Dr. Sinem BUDAK

Ağrı Asker Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve
Klinik Mikrobiyoloji Servisi, Ağrı-Türkiye

E-posta: budaksinem@yahoo.com