

Türkiye’de 2014 Yılı İçinde İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Araştırılması*

Investigation of Carbapenemases in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated in 2014 in Turkey

Aslı ÇAKAR¹, Yakut AKYÖN¹, Deniz GÜR¹, Onur KARATUNA², Dilara ÖĞÜNÇ³,
Betül ÖZHAK BAYSAN³, Nilay ÇÖPLÜ⁴, Mustafa ÇAĞATAY⁴, Abdullah KILIÇ⁵,
Mehmet BAYSALLAR⁵, Zahir BAKICI⁶, Cem ÇELİK⁶, Zeynep GÜLAY⁷, Şöhret AYDEMİR⁸,
Alper TÜNGER⁸, Hüseyin KILIÇ⁹, Barış Derya ERÇAL⁹, Zulal AŞCI TORAMAN¹⁰,
Yasemin ZER¹¹, Ayşe BÜYÜKTAŞ¹¹, Selma AY¹², Zerrin AKTAŞ¹³, Çiğdem KAYACAN¹³,
Gülçin BAYRAMOĞLU¹⁴, Faruk AYDIN¹⁴, Devrim DÜNDAR¹⁵, Ufuk HASDEMİR¹⁶,
Ramazan AYAŞ¹⁶, Kerametin YANIK¹⁷, Murat GÜNAYDIN¹⁷, Hüseyin GÜDÜCÜOĞLU¹⁸,
Mehmet PARLAK¹⁸

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

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

² Acıbadem Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

² Acıbadem University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

³ Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Antalya.

³ Akdeniz University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Antalya, Turkey.

⁴ Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

⁴ Ankara Diskapı Yıldırım Beyazıt Training and Research Hospital, Microbiology Laboratory, Ankara, Turkey.

⁵ Gülhane Askeri Tıp Akademisi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

⁵ Gulhane Military Medical Academy, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

⁶ Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Sivas.

⁶ Cumhuriyet University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Sivas, Turkey.

⁷ Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁷ Dokuz Eylül University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

⁸ Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir.

⁸ Ege University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Izmir, Turkey.

⁹ Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri.

⁹ Erciyes University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kayseri, Turkey.

¹⁰ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ.

¹⁰ Fırat University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Elazig, Turkey.

- ¹¹ Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gaziantep.
¹¹ *Gaziantep University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Gaziantep, Turkey.*
- ¹² İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Malatya.
¹² *Inönü University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Malatya, Turkey.*
- ¹³ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
¹³ *Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.*
- ¹⁴ Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.
¹⁴ *Karadeniz Technical University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Trabzon, Turkey.*
- ¹⁵ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kocaeli.
¹⁵ *Kocaeli University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Kocaeli, Turkey.*
- ¹⁶ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
¹⁶ *Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.*
- ¹⁷ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Samsun.
¹⁷ *Ondokuz Mayıs University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Samsun, Turkey.*
- ¹⁸ Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van.
¹⁸ *Yüzüncü Yıl University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Van, Turkey.*

* Bu çalışma, XXXVI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (12-16 Kasım 2014, Antalya)'nde poster olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 11.06.2015 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 19.12.2015

ÖZ

Tüm dünyada *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri arasında çoklu ilaç direncine sahip izolatlar artış göstermekte ve tedavide son seçenek olarak kabul edilen karbapenemlere karşı bu izolatlarda bulunabilen karbapenemazlar tedavide başarısızlıklara yol açabilmektedir. Bu enzimlerin ülkemizdeki sıklıklarına ilişkin çok merkezli çalışmalar bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı, European Survey on Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) projesi kapsamında, Türkiye'nin değişik bölgelerindeki merkezlerden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığını ve enzim tiplerini belirlemektir. Türkiye'de belirlenmiş 18 merkezden Kasım 2013 tarihinden itibaren ilk altı aylık süre içinde karbapenem grubu antibiyotiklerden (imipenem, meropenem veya ertapenem) en az birine dirençli olarak saptanan ilk 10 klinik izolat koordinatör merkeze gönderilmiştir. İzolatlarda imipenem, meropenem ve ertapenem antibiyotik duyarlılıkları mikrodilüsyon yöntemi ile EUCAST standartlarına göre araştırılmış ve karbapenemaz varlığı fenotipik olarak kombinasyon sinerji testi ile doğrulanmıştır. Karbapenemaz tipleri, VIM, IMP, NDM, KPC ve OXA-48 karbapenemaz genlerine özgül primerler kullanılarak multipleks-polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile araştırılmıştır. Altı aylık süre içinde, koordinatör merkeze, karbapenemaz varlığı şüpheli 155 klinik izolat [21'i (%13.5) *E.coli*, 134'ü (%86.5) *K.pneumoniae*] gönderilmiştir. *E.coli* izolatlarının 19'ünde (%90.5) ve *K.pneumoniae* izolatlarının 124'ünde (%92.5) olmak üzere toplam 155 izolatin 143'ünde (%92.3) genotipik olarak en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Bu enzimler 136 izolatta tek başına (OXA-48: %84.6; NDM: %6.3; VIM: %2.8; IMP: %1.4) bulunurken, yedi izolatta iki enzim bir arada (OXA-48 + NDM: %2.1; OXA-48 + VIM: %2.1; VIM + NDM: %0.7) olarak tespit edilmiştir. İzolatların hiç birinde KPC enzimi gözlenmemiştir. Mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre OXA-48 pozitif izolatların imipenem, meropenem ve ertapeneme direnç yüzdeleri sırasıyla %59.5, %52.9 ve %100 olarak belirlenmiştir. Karbapenemaz varlığının doğrulanması için yapılan kombinasyon sinerji testinin moleküler test ile %100 uyumlu olduğu saptanmıştır. OXA-48 enzimi içeren izolatların birçoğunun meropeneme duyarlı ancak tamamının ertapeneme dirençli olması nedeniyle, karbapenemaz taramasında ertapenemin en uygun antibiyotik olduğu, ekipman ve maliyet gerektiren moleküler yöntemlerin uygulanmadığı merkezlerde sinerji tekniğine dayalı bu fenotipik yöntemin güvenle kullanılabileceği sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: Karbapenemaz; *Enterobacteriaceae*; OXA-48; metallo-beta-laktamaz; Türkiye.

ABSTRACT

Carbapenems are the choice of treatment in infections caused by multidrug resistant *Enterobacteriaceae*. In recent years carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates due to carbapenemases have been increasingly reported worldwide. Multicenter studies on carbapenemases are scarce in Turkey. The aim of this study was to determine the distribution of carbapenemases from different parts of Turkey as a part of the European Survey of Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE) project. Beginning in November 2013, carbapenem-resistant isolates resistant to at least one of the agents, namely imipenem, meropenem, and ertapenem were sent to the coordinating center. Minimum inhibitory concentrations for these carbapenems were determined by microdilution tests following EUCAST guidelines. Production of carbapenemase was confirmed by combination disk synergy tests. Types of carbapenemases were investigated using specific primers for VIM, IMP; NDM, KPC and OXA-48 genes by multiplex polymerase chain reaction. In a six month period, 155 suspected carbapenemase-positive isolates were sent to the coordinating center of which 21 (13.5%) were *E.coli* and 134 (86.5%) were *K.pneumoniae*. Nineteen (90.5%) strains among *E.coli* and 124 (92.5%) strains among *K.pneumoniae* were shown to harbour at least one carbapenemase gene by molecular tests, with a total of 92.3% (143/155). Carbapenemases were determined as a single enzyme in 136 strains (OXA-48: 84.6%; NDM: 6.3%; VIM: 2.8%; IMP: 1.4%) and as a combination in seven isolates (OXA-48 + NDM: 2.1%; OXA-48 + VIM: 2.1%; VIM + NDM: 0.7%). KPC was not detected in any of the isolates. According to the microdilution test results, resistance to imipenem, meropenem and ertapenem in OXA-48 isolates were 59.5%, 52.9% and 100%, respectively. The combination disk synergy test was 100% compatible with the molecular test results. As most of the OXA-48 producing isolates were susceptible to meropenem but all were resistant to ertapenem, ertapenem seems to be the most sensitive agent in screening carbapenemases in areas where OXA-48 is prevalent and phenotypic combination tests can be useful in centers where molecular tests are not available.

Keywords: Carbapenemase; *Enterobacteriaceae*; OXA-48; metallo-beta-lactamase; Turkey.

GİRİŞ

Enterobacteriaceae ailesi içinde çoklu ilaç direncine sahip izolatlar tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de hızla artmaktadır. Bu izolatlar, karbapenemler gibi ciddi enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olan antibiyotiklere de dirençli olabilmekte ve bu direnç gelişimi klinik tedavi seçeneklerini kısıtlayarak tedavide başarısızlıklara yol açabilmektedir. Enterik bakterilerde karbapenem direncine neden olan iki temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan ilki, karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzimlerinin varlığıdır. Bu enzimler içerisinde en sık, 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) karbapenem direncine neden olabilmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenemlere azalmış duyarlılığın diğer bir nedeni de, porin kaybı ile beraber izolatta bulunabilen geniş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) ve/veya AmpC enzimlerinin varlığıdır¹. Karbapenemaz içeren izolatlar tüm beta-laktam antibiyotiklere dirençli hale gelmelerinin yanı sıra, bu izolatlarda florokinolon, aminoglikozid ve ko-trimoksazole karşı da genellikle direnç gözlenmektedir. Ülkemizin de içinde bulunduğu birçok Avrupa ülkesinde OXA-48 içeren izolatlar salgınlara yol açmakta ve prevalansı hızla artış göstermektedir^{2,3}.

Kazanılmış karbapenemaz içeren bakterilerin yayılımı, önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Bu nedenle, bu izolatların saptanması, enfeksiyon kontrolünde oldukça

önemlidir ve rutin bakteriyoloji laboratuvarlarında kullanılmak üzere güvenilir tanı testlerine ihtiyaç duyulmaktadır⁴. *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında direnç varlığının taranması ve doğrulanmasına yönelik farklı fenotipik ve genotipik yöntemler geliştirilmiştir. Avrupa'da, merkezi Hollanda'da bulunan "European Survey on Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE)" adlı kuruluş, tüm Avrupa ülkelerinde karbapenemaz içeren enterik bakterilerin sıklığını ve yayılımını araştıran bir merkezdir. Bu çalışmanın amacı, EuSCAPE projesi kapsamında Türkiye'de belirlenen 18 merkezden izole edilen ve karbapenemaz şüphesi bulunan *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığını ve enzim tiplerini belirlemektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatlarının Toplanması

Belirlenen 18 merkezden, Kasım 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında, klinik örneklerden izole edilen ve gerek otomatize sistemler ile gerekse manuel antibiyotik duyarlılık testlerine göre en az bir karbapenem grubu antibiyotiğe dirençli olan ya da azalmış duyarlılığı bulunan ilk 10 *K.pneumoniae* ve/veya *E.coli* klinik izolatu merkezimize gönderildi. Bakteri izolatları çalışılncaya kadar stoklanarak -20°C'de saklandı.

Fenotipik Testler ile Karbapenemaz Tayininin Yapılması

Karbapenemaz varlığını fenotipik olarak test etmek üzere KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kiti (Rosco Diagnostica, Danimarka) kullanıldı. Kontrol suşu olarak EuSCAPE tarafından gönderilen OXA-48, KPC, NDM, VIM ve IMP pozitif *K.pneumoniae* izolatları kullanıldı. Bakteri izolatlarının taze kültürlerinden hazırlanan bakteri süspansiyonu McFarland 0.5'e ayarlanarak Mueller-Hinton agaraya yayıldı. Kit içerisinde bulunan meropenem, meropenem + kloksasilin, meropenem + dipikolinik asit, meropenem + boronik asit ve temosilin diskleri ekili plaklara yerleştirildi. Plaklar bir gece 35°C'de inkübe edildi. İnkübasyon sonrası her disk için inhibisyon zon çapları ölçülerek meropenem inhibisyon zon çapı ile karşılaştırıldı. KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kiti değerlendirme kriterleri Tablo 1'de gösterildi.

Mikrodilüsyon Yöntemiyle İmipenem, Meropenem ve Ertapenem Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (Mik) Saptanması

Karbapenemaz şüpheli izolatlarda imipenem, meropenem ve ertapenem Mik değerleri mikrodilüsyon yöntemiyle saptandı. Antibiyotik konsantrasyonları 128-0.06 µg/ml olacak

Tablo 1. Rosco KPC, MBL ve OXA-48 Karbapenemaz Doğrulama Kiti Değerlendirme Kriterleri

MEM + BO	MEM + DPA	MEM + CL	Temosilin	β-laktamaz
≥ 4 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥12 mm	AmpC
< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	Değişken	MBL
≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Değişken	KPC
	≤ 3 mm	≤ 3 mm	İnhibisyon zonu yok	OXA-48 benzeri

MEM: Meropenem; BO: Boronik asit; DPA: Dipikolinik asit; CL: Kloksasilin.

şekilde ayarlandı. Kontrol suşu olarak *E.coli* ATCC 25922 kullanıldı. Sonuçlar EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) kriterlerine göre değerlendirildi⁵. Meropenem ve imipenem MİK değerleri $\geq 2 \mu\text{g/ml}$ ve ertapenem MİK değeri $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ dirençli olarak değerlendirildi. Karbapenemaz varlığı için tarama kriteri olarak EUCAST'ın önerisi doğrultusunda MİK değeri meropenem ve ertapenem için $> 0.12 \mu\text{g/ml}$ ve imipenem MİK değeri $> 0.5 \mu\text{g/ml}$ olarak alındı.

Karbapenemazların moleküler yöntemle tayini

Merkezlerden gönderilen karbapenemaz şüpheli izolatlarda karbapenemaz varlığı, karbapenemaz genine özgül primer setleri kullanılarak multipleks polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle araştırıldı. Kontrol suşları olarak EuSCAPE tarafından gönderilen OXA-48, KPC, NDM, VIM ve IMP pozitif *K.pneumoniae* izolatları kullanıldı. Kalıp DNA'nın hazırlanması için izolatlar bir gece 37°C'de Mueller Hinton buyyonda inkübe edildi. Bakteri süspansiyonları 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Çökelti üzerine 1 ml Tris-EDTA (TE) tamponu eklenerek homojenize edildikten sonra tekrar 10000 rpm'de santrifüj edildi ve çökelti üzerine 1 ml TE tamponu kondu. Bu yıkama işlemi beş kez tekrarlandı. Daha sonra çökelti üzerine 100 μl TE tamponu eklenerek 30 dakika su banyosunda kaynatıldı. On dakika 14000 rpm'de santrifüj sonrası üst sıvı steril mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. PCR, toplam 25 μl hacimde gerçekleştirildi. Tepkime karışımı; steril distile su, 1x PCR tamponu, 0.2 mM dNTP, 2.5 mM MgCl₂, 0.250U Taq polimeraz, her bir primer setinden 20 pmol ve 2.5 μl kalıp DNA olacak şekilde hazırlandı. Her izolat için KPC, NDM ve OXA-48 gen bölgelerine özgül primer setleri kullanılarak TC-3000 (Techne Prime Thermal Cyclers, İngiltere) cihazında 95°C'de 5 dakika ilk denatürasyon aşamasının ardından, 95°C'de 45 saniye denatürasyon, 60°C'de 45 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 35 döngü ve son uzama olarak 72°C'de 8 dakika⁶ ve her izolat için IMP ve VIM gen bölgelerine özgül primer setleri kullanılarak 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyon aşamasının ardından 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 52°C'de 40 saniye bağlanma ve 72°C'de 50 saniye uzama ile toplam 36 döngü ve son uzama olarak 72°C'de 5 dakika olmak üzere polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi⁷. Amplifiye edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntülendi. Kullanılan primer dizileri ve bant büyüklükleri Tablo II'de gösterildi.

BULGULAR

Kasım 2013'den itibaren ilk 6 aylık süre içinde EuSCAPE projesi kapsamında Türkiye'nin çeşitli bölgelerinden belirlenen 18 merkezden, koordinatör merkeze toplam 155 karbapenemaz şüpheli *K.pneumoniae* (n= 134, %86.5) ve *E.coli* (n= 21, %13.5) izolatu gönderilmiştir. Karbapenemaz varlığı şüpheli 21 *E.coli* izolatının 19'unda (%90.5) ve 134 *K.pneumoniae* izolatının 124'ünde (%92.5) fenotipik yöntemle karbapenemaz varlığı saptanmıştır. Uygulanan multipleks PCR analizi ile, fenotipik yöntemle tespit edilen karbapenemaz varlığı doğrulanmıştır. Fenotipik test ile moleküler yöntemin karbapenemaz varlığını saptama açısından %100 uyumlu olduğu görülmüştür. Çalışılan 155 karbapenemaz şüpheli izolatın 143'ünde (%92.3) genotipik olarak en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Saptanan karbapenemaz enzimlerinin türlere göre dağılımı Tablo III'de verilmiştir.

Tablo II. Karbapenemaz Varlığının Moleküler Tayininde Kullanılan Primer Dizileri ve Elde Edilen Bant Büyüklükleri^{6,7}

Karbapenemaz geni	Primer dizileri	Bant büyüklüğü (bç)
<i>bla</i> _{KPC}	5'-TGTCAGTGTATCGCGGTC-3' 5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAAC-3'	900
<i>bla</i> _{NDM}	5'-GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC-3' 5'-GGTCGGAAGCTGAGCACC GCAT-3'	782
<i>bla</i> _{VIM}	5'-GATGGTGTGGTTCGCATA-3' 5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	390
<i>bla</i> _{IMP}	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCT-3' 5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	188
<i>bla</i> _{OXA-48}	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	438

Tablo III. Karbapenemaz Varlığı Saptanan *K.pneumoniae* ve *E.coli* İzolatında Karbapenemaz Tiplerinin Dağılımı (n= 143)

Karbapenemaz geni	<i>E.coli</i>	<i>K.pneumoniae</i>	Toplam
	Sayı (%)	Sayı (%)	Sayı (%)
OXA-48	18 (94.7)	103 (83.1)	121 (84.6)
NDM	1 (5.3)	8 (6.5)	9 (6.3)
VIM	0	4 (3.2)	4 (2.8)
IMP	0	2 (1.6)	2 (1.4)
OXA-48 + NDM	0	3 (2.4)	3 (2.1)
OXA-48 + VIM	0	3 (2.4)	3 (2.1)
VIM + NDM	0	1 (0.8)	1 (0.7)
Toplam	19 (100)	124 (100)	143 (100)

Onsekiz merkezden gelen karbapenemaz şüpheli 155 izolattan en az bir karbapenemaz enzimi içeren 143 izolatın 121'inde (%84.6) OXA-48 enzimi saptanmıştır. İkinci sıklıkta saptanan NDM enzimi, tek başına özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesinde bulunan merkezlerden gönderilen izolatlarda tespit edilmiştir. Tek başına VIM veya IMP içeren izolatlar iki merkezden izole edilmişken, hiçbir izolatta KPC enzimi saptanmamıştır. Merkezlerden gönderilen izolatlarda saptanan enzimlerin merkezlere göre dağılımı Tablo IV'de verilmiştir.

Karbapenemaz şüphesi ile gönderilen 155 izolatta mikrodilüsyon yöntemi ile imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri araştırılmış; sadece OXA-48 pozitif olan 121 izolatın 72'si (%59.5) imipeneme, 64'ü (%52.9) meropeneme ve tümü (%100) ertapeneme dirençli olarak bulunmuştur. EUCAST'ın karbapenemaz taraması için öngörülen sınır değerler açısından değerlendirildiğinde; 12 izolatın (%9.9) meropenem MİK değeri > 0.12 µg/ml'nin altında saptanmıştır. Buna karşılık MBL içeren izolatların tamamı test edilen her üç antibiyotiğe de dirençli olarak bulunmuştur. OXA-48 pozitif 121

Tablo IV. Onsekiz Merkezden Gönderilen, 155 Karbapenemaz Şüpheli İzolattan 143'ünde Saptanan Karbapenemaz Enzimlerinin Merkezlere Göre Dağılımı

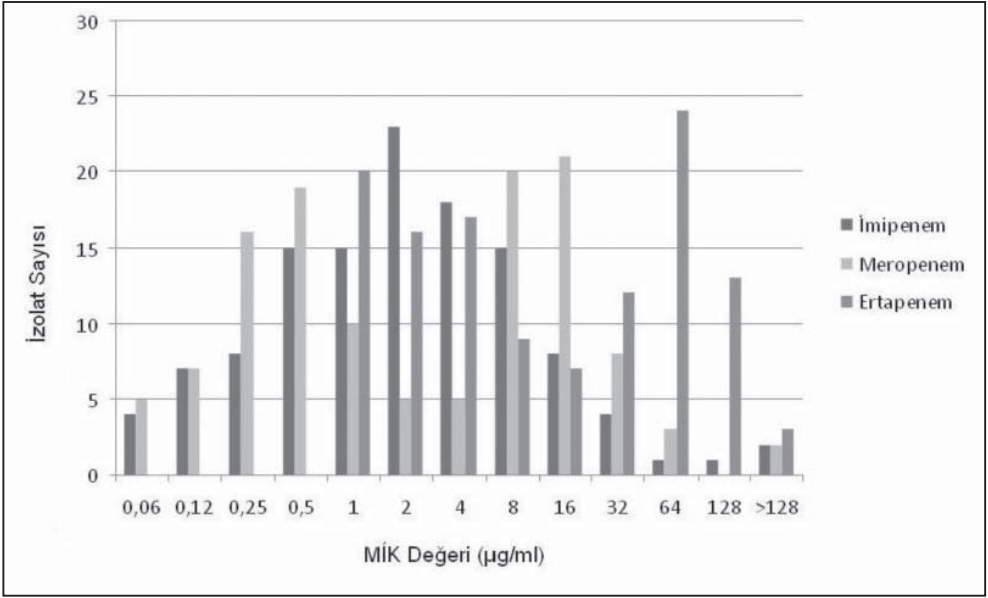
Merkez*	Çalışılan izolat sayısı	Karbapenemaz enzimi							
		OXA-48	VIM	IMP	NDM	KPC	OXA + VIM	OXA + NDM	VIM + NDM
1	10	10							
2	9	9							
3	3	1							
4	10	9					1		
5	2	2							
6	10	10							
7	10	10							
8	10	10							
9	9	3			5			1	
10	10	7			2		1		
11	10	10							
12	10	5			2				
13	8	7						1	
14	10	5	1	1					
15	10	6						1	1
16	10	4	3	1			1		
17	9	8							
18	5	5							

* 1: Acıbadem Üniversitesi (Üniv); 2: Akdeniz Üniv; 3: Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Eğitim ve Araştırma Hastanesi; 4: Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 5: Cumhuriyet Üniv; 6: Dokuz Eylül Üniv; 7: Ege Üniv; 8: Erciyes Üniv; 9: Fırat Üniv; 10: Gaziantep Üniv; 11: Hacettepe Üniv; 12: İnönü Üniv; 13: İstanbul Üniv; 14: Karadeniz Teknik Üniv; 15: Kocaeli Üniv; 16: Marmara Üniv; 17: Ondokuz Mayıs Üniv; 18: Yüzüncü Yıl Üniv.

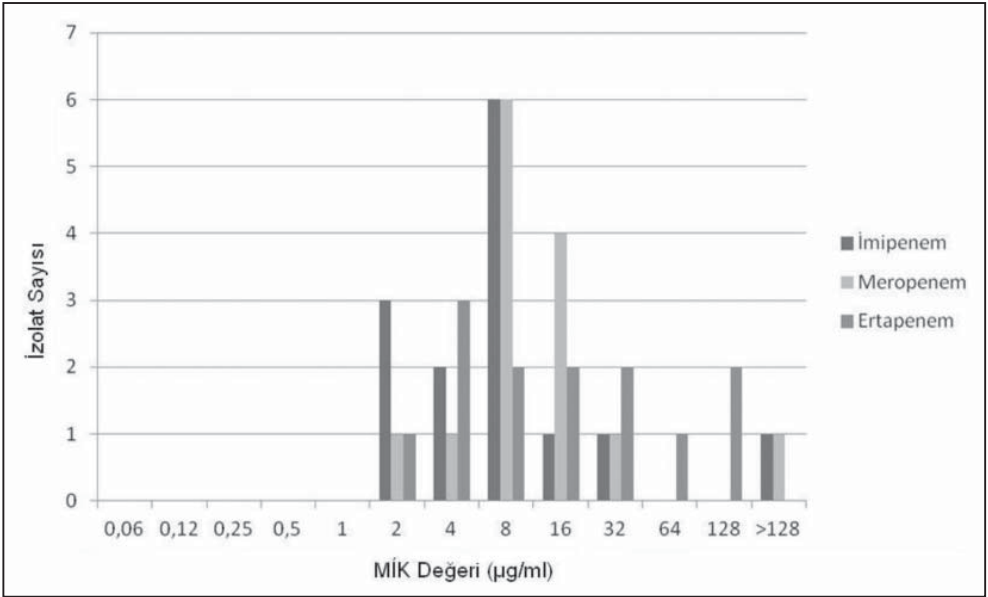
izolatın ve MBL pozitif bulunan 15 izolatın imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerlerinin dağılımı Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir.

TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesi içinde özellikle *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında karbapenemaz üreten izolatlar hızla artış göstermektedir. Bu izolatların gerek yayılımının önlenmesinde, gerekse oluşturdukları enfeksiyonların uygun tedavisinde, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında karbapenemaz üreten izolatların tanımlanması önem taşımaktadır. Karbapenemaz içeren izolatlarda antibiyotik duyarlılıkları değişkenlik gösterebilmektedir. Karbapenemaz yanında GSBL veya AmpC tipi enzim de içeren izolatlarda MİK değerleri yüksek saptanırken, bazı karbapenemazlar tek başlarına karbapenem MİK değerlerinde zayıf yükselmelere yol açabilmekte ve izolat karbapenemaz içerdiği halde duyarlılık sınırları içinde saptanabilmektedir. Böyle bir durumda bu tip izolatların gözden kaçırılması olasıdır. EUCAST kriterlerine göre meropenem, imipenem ve ertapenemin sınır değerleri sırasıyla 2 µg/ml, 2 µg/ml ve 0.5 µg/ml'dir. Karbapenemaz açısından tarama kriteri olarak ise meropenem, imipenem ve ertapenem MİK değerleri sırasıyla > 0.12 µg/ml, > 1 µg/ml ve > 0.12 µg/ml olan izolatlar doğrulama testlerinin yapılması önerilmektedir⁸. Bu sınır değerlerin seçimi, karbapenemaz genini zayıf ifade eden ve bu nedenle duyarlılık sınırları içinde kalan izolatların gözden kaçırılmaması için öngörülen değerlerdir.



Şekil 1. OXA-48 pozitif bulunan 121 izolatın imipenem, meropenem ve ertapenem MİK dağılımları.



Şekil 2. Metallo-beta-laktamaz pozitif bulunan 15 izolatın imipenem, meropenem ve ertapenem MİK dağılımları.

EUCAST, karbapenemaz taraması için özellikle meropenemi önermektedir. Meropenemin sınıf A tipi enzimler için taramada duyarlılığının çok yüksek olduğu saptanmıştır. Karbapenemaz taramasında ertapenem ve imipenemin bazı dezavantajları bulunmak-

tadır. Sınıf A karbapenemazlar içinde bulunan KPC tipi enzimlerin dışında kalan diğer enzimler ertapeneme duyarlıdır. Bunun yanı sıra, ertapeneme direnç için izolatta bulunabilen AmpC veya GSBL ile birlikte porin kaybı yeterli olabilmektedir. Bu nedenle ertapenemin, karbapenemaz taramasında imipenem ve meropeneme göre özgülüğü düşüktür. İmipenem de taramada önerilmeyen diğer bir karbapenemdir. *Proteus*, *Serratia*, *Providencia* ve *Morganella* izolatlarında karbapenemaz bulunmaksızın farklı mekanizmalar ile imipeneme direnç gelişmektedir⁹.

Gram-negatif basillerde birçok karbapenem hidrolizi yapan enzim tanımlanmış olsa da, en sık Ambler sınıf A (KPC tipi), sınıf B (VIM, NDM ve IMP tipi) ve sınıf D (OXA-48 benzeri) enzimler bu dirençten sorumludur. Aynı zamanda plazmid kaynaklı sefalosporinazlardan Ambler sınıf C'de yer alan AmpC enzimlerinin de karbapenem hidrolizi yapabildikleri bilindiğinden, karbapenemaz taramasında bu enzimlerin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir⁸. Karbapenem hidrolizi yapan enzimler içinde bulunan OXA-48 enzimi, ilk defa 2001 yılında ülkemizde bir *K.pneumoniae* izolatında saptanmıştır¹⁰. Uzun yıllar ülkemize özgü bir enzim olarak kalan OXA-48, 2008 yılından itibaren birçok ülkede saptanmaya başlanmıştır. Sporadik olguların yanı sıra, bu enzimi taşıyan izolatlar ile Belçika, Fransa, Yunanistan, Hollanda ve İspanya'da salgınlar meydana gelmiştir¹¹. OXA-48 enzimi; klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmayan, penisilinleri yüksek düzeyde, karbapenemleri düşük düzeyde hidroliz edebilen, geniş spektrumlu sefalosporinlere zayıf aktivite gösteren bir enzimdir. Bu enzimi içeren izolatlarda saptanan düşük MİK değerleri izolatların gözden kaçmasına ve bu nedenle direncin fark edilmeden yayılmasına neden olmaktadır¹²⁻¹⁴.

Bu çalışmada, EuSCAPE projesi kapsamında, merkezimize gönderilen karbapenemaz şüpheli izolatlarda imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri araştırılmıştır. Metallo-beta-laktamaz (MBL) pozitif saptanan toplam 15 izolatın hepsi her üç karbapeneme de dirençli olarak saptanmıştır. Ancak karbapenemaz şüphesi ile gönderilen ve karbapenemaz enzimi açısından sadece OXA-48 içeren 121 izolatla her üç karbapenem için alınan MİK değerlerinin oldukça değişken olduğu gözlenmiştir. İzolatların 49'u (%40.5) imipeneme ve 64'ü (%47.1) meropeneme duyarlı olarak saptanırken, hiçbir izolat ertapeneme duyarlı bulunmamıştır. EUCAST tarama kriterleri açısından değerlendirildiğinde ise, OXA-48 pozitif 121 izolatın 12'sinin (%9.91) meropenem açısından tarama kriterinin (> 0.12 µg/ml) altında kaldığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, her ne kadar EUCAST tarafından taramada meropenem öneriliyor olsa da, OXA-48 içeren izolatların yaklaşık 10'unun gözden kaçırılacağı görülmektedir. Buna karşın özgülüğü düşük olmakla birlikte ertapenem MİK değerleri tüm OXA-48 içeren izolatlarda tarama değeri olan > 0.12 µg/ml'nin üzerinde saptanmıştır. Bu nedenle, OXA-48'in çok yaygın görüldüğü ülkemizde karbapenemaz tarama kriteri olarak ertapenemin kullanılmasının daha uygun olacağı düşünülmektedir. Daha önce yapılan bazı araştırmalar, bu çalışmadan çıkan sonuçları destekler niteliktedir. Kanada'dan yapılan bir çalışmada, OXA-48 içeren izolatların meropenem ve imipeneme duyarlı olabileceği, bu nedenle de taramada ertapenemin kullanılması gerektiği belirtilmiştir¹⁵. Yapılan çok merkezli bir çalışmada, ülkemizin de aralarında bulunduğu 10 ülkeden, 2001-2011 yılları arasında izole edilmiş

OXA-48 pozitif *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri antibiyotik gradiyent test yöntemi ile retrospektif olarak değerlendirilmiş, izolatların %34.1'i imipeneme, %33'ü meropeneme ve %90.1'i ertapeneme dirençli bulunmuştur. Bu bulgular sonucunda, ertapenemin özellikle OXA-48'in yaygın olarak bulunduğu bölgelerde karbapenemaz açısından taramaya en uygun antibiyotik olduğu görüşü elde edilmiştir¹¹. Belçika'dan yapılan benzer bir çalışmada da, OXA-48 pozitif izolatların %40'ı imipeneme, %48'i meropeneme dirençli olarak saptanırken, tüm izolatların ertapeneme dirençli oldukları belirlenmiştir¹⁶. Ertapenem direnci, karbapenemaz taramasında en duyarlı gösterge olmakla birlikte, karbapenemaz prevalansının düşük olduğu bölgelerde düşük pozitif prediktif değere (PPV) sahiptir. EUCAST'ın önerisine göre, disk difüzyon yönteminin kullanıldığı durumlarda meropenem inhibisyon zonu < 25 mm olan izolatların karbapenemaz açısından taranması önerilmektedir. Ancak bu kriterin uygulandığı bir çalışmada, OXA-48 pozitif 323 izolatın 80'i gözden kaçırılmıştır¹⁷. Bu nedenle EUCAST, özellikle OXA-48'in yaygın olarak bulunduğu bölgelerde, tarama kriteri olarak meropenem inhibisyon zonu < 27 mm olan izolatların taranmasını önermektedir⁵. OXA-48'in yaygın olarak bulunduğu bölgelerde, temosilin inhibisyon zonunun < 12 mm veya MİK değerinin > 128 mg/L olması, izolatta OXA-48'in bulunabileceğine dair kuvvetli bir gösterge olarak karşımıza çıkmaktadır¹⁷. Bizim çalışmamızda da, genotipik olarak OXA-48 varlığının doğrulandığı tüm izolatlarda Rosco diskleri ile yapılan fenotipik testlerde temosilin inhibisyon zonunun < 12 mm'nin altında olduğu belirlenmiştir. Ancak test 15 adet MBL (IMP, VIM ve/veya NDM) pozitif izolata uygulandığında, tüm izolatlarda meropenem diskinde belirlenen inhibisyon çapına göre, meropenem ve dipikolinik asidin bulunduğu inhibisyon zon çapında 4 mm ve üzeri bir artış saptanmakla birlikte bu izolatlardan sekizinde temosilin inhibisyon zonunun < 12 mm olduğu gözlenmiştir. Bu durumda temosilin direnci MBL'den kaynaklanabileceği gibi izolatta MBL yanında OXA-48'in de bulunabilme olasılığı vardır. Bu nedenle bu tür izolatlarda mutlaka genotipik doğrulama yapılmalıdır. Yapılan moleküler test sonucunda, bu izolatların sadece MBL içerdiği saptanmıştır. Benzer şekilde yapılan bir çalışmada, DPA ile sinerji verdiği tespit edilen 31 adet MBL pozitif izolattan 20'si aynı zamanda temosilin direnci de göstermiştir¹⁸.

Dünyada karbapenemaz üreten enterik bakterilerin hızla artış göstermesi, bu izolatların tanımlanmasında güvenilir fenotipik testlere olan ihtiyacı gündeme getirmiştir. Duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir metodun bulunması, bu patojenler ile gelişen enfeksiyonların gerek tedavisinde gerekse yayılımının önlenmesinde önemlidir⁸. EUCAST son rehberinde, tarama kriterlerine uygun olan izolatlarda fenotipik değerlendirme yöntemi olarak Rosco'nun KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kitininin kullanımını önermektedir⁵. Yapılan birçok çalışmada, doğrulama testinin karbapenemazları tanımlamada genotipik testlere göre duyarlılık ve özgüllüğü %95-100 arasında saptanmıştır^{1,8,19-22}. Bizim çalışmamızda, karbapenemaz şüphesiyle merkezimize gönderilen toplam 155 klinik izolatta karbapenemaz varlığı genotipik yöntemler ile araştırılmış, bu izolatlar aynı zamanda Rosco KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kiti ile de test edilmiştir. Tüm izolatlarda tespit edilen fenotipik test sonuçlarının, moleküler yöntemler ile elde edilen sonuçlar ile %100

uyumlu olduğu saptanmıştır. Ancak ülkemizde Rosco KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kiti bulunmamaktadır. Bu kitin eşdeğeri olan, ülkemizde temin edilebilen ve aynı prensibe dayanan farklı firmaların doğrulama kiti mevcuttur. Ülkemizde bu firmalara ait KPC, MBL ve OXA-48 doğrulama kiti ile daha önce yapılan bir çalışma bulunmadığından, bundan sonraki çalışmalarda bu kitlerin değerlendirilmesine yönelik geniş çaplı araştırmalara ihtiyaç vardır. Diğer yandan, gerek Rosco gerekse diğer bazı firmaların doğrulama testinde kullandıkları disklerin içeriği bilinmektedir. Bu nedenle her merkez bu diskleri kendi imkanları ile hazırlayabilmektedir. İsveç'te yapılan bir çalışmada, genotipik olarak KPC, IMP, VIM veya OXA-48 olarak tanımlanmış izolatlarda, fenotipik test olarak kendi hazırladıkları diskleri kullanarak kombinasyon disk testi uygulanmış ve duyarlılık %100 ve özgüllük %98 olarak saptanmıştır²³.

Karbapenemazların tanımlanmasında aynı zamanda MALDI-TOF veya spektrofotometrik yöntemler de uygulanabilmektedir. Ancak bu tür yöntemleri uygulamak için ekipmana gerek duyulması nedeniyle kombinasyon sinerji testi rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek pratik, güvenilir ve maliyeti düşük bir testtir¹⁸.

Karbapenemaz şüphesi ile merkezimize gönderilen toplam 155 klinik izolatın 143'ünde uygulanan moleküler yöntemle en az bir karbapenemaz enzimi belirlenmiştir. Bu izolatlarda en sık saptanan enzim, sınıf D karbapenemazlar içinde yer alan OXA-48 enzimi (%84.6) olup, OXA-48 yaygın olarak tüm merkezlerde saptanmıştır. Daha önce ülkemizde bu konuda yapılan çalışmalarda da, benzer şekilde her merkezden yaygın olarak OXA-48 enzimi bildirilmiştir²⁴⁻²⁶.

MBL grubunda bulunan VIM, IMP ve NDM enzimleri, daha önce yapılan tek merkezli bazı yayınlarda araştırılmış ve genel olarak nadir saptandığı sonucuna varılmıştır²⁷⁻²⁹. Bizim çalışmamızda da 18 merkezden gönderilen izolatlar arasında VIM ve IMP enziminin saptanma oranı, sırasıyla %2.8 ve %1.4 olarak bulunmuştur. NDM enzimi, ülkemizde ilk defa 2011 yılında İstanbul'da bir *K.pneumoniae* izolatında saptanmıştır³⁰. Daha sonraki yıllarda, İstanbul²⁶ ve Kayseri'den³¹ yapılmış tek merkezli çalışmalarda da NDM enziminin varlığı belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalardan farklı olarak, bizim çalışmamızda NDM enziminin OXA-48'den sonra ikinci sıklıkta (%6.3) saptanan enzim olduğu belirlenmiştir. On sekiz merkezden gönderilen izolatlar arasında tek başına NDM saptanan izolatların tamamı, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'ndeki merkezlerden gönderilen izolatlardır. NDM'nin bu bölgede daha yaygın olarak görülmesinin muhtemel nedenleri, bölgede son zamanlarda artan göç ve hijyenik koşullarda yaşanan problemler olabilir. Ayrıca NDM enzimi, diğer çalışmalarda olduğu gibi Marmara Bölgesi'nden iki merkezde de saptanmıştır. Marmara Bölgesi'nden bir merkezde OXA-48 enzimi ile birlikte, diğer merkezde ise bir izolatta OXA-48 ile birlikte, diğer bir izolatta ise VIM ile birlikte saptanmıştır. NDM enzimini bulunduran izolatlar diğer MBL'larla olduğu gibi daha yüksek karbapenem MİK değerlerine sahiptir.

Sınıf A karbapenemaz grubunda bulunan KPC enzimi ülkemizde ilk defa 2014 yılında bir *K.pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır³². Bizim çalışmamızda ise, 18 merkezden gönderilen izolatların hiçbirinde KPC enzimi varlığına rastlanmamıştır.

Sonuç olarak, Türkiye'de 18 merkezden gönderilen karbapenemaz şüpheli izolatlar incelendiğinde; OXA-48 enziminin yaygın olarak saptandığı, NDM enziminin özellikle Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde bulunan merkezlerde saptandığı, IMP ve VIM gibi enzimlere daha az sıklıkta rastlandığı ve KPC enziminin incelenen izolatların hiçbirinde bulunmadığı görülmüştür. OXA-48 enzimi içeren izolatların birçoğunun meropeneme duyarlı, ancak tamamının ertapeneme dirençli olması nedeniyle, karbapenemaz taramasında ertapenemin en uygun antibiyotik olduğu; karbapenemaz varlığının doğrulanması amacıyla uygulanan kombine disk sinerji testinin moleküler yöntem sonuçları ile uyumlu bulunması nedeniyle ekipman ve maliyet gerektiren moleküler yöntemlerin uygulanmadığı merkezlerde sinerji tekniğine dayalı bu fenotipik yöntemin güvenle kullanılabilirliği sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect* 2014; 44(2): 51-6.
2. Canton R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18(5): 413-31.
3. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm. *Trends Mol Med* 2012; 18(5): 263-72.
4. Woodford N, Pike R, Meunier RL, Hill R, Hopkins KL. In vitro activity of temocillin against multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp., and evaluation of high-level temocillin resistance as a diagnostic marker for OXA-48 carbapenemase. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(2): 564-7.
5. Leclercq R, Canton R, Brown DF, et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(2): 141-60.
6. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout D. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 3877-80.
7. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2): 321-2.
8. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palu G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. *Gut Pathog* 2014; 6:13.
9. Willems E, Verhaegen J, Magerman K, Nys S, Cartuyvels R. Towards a phenotypic screening strategy for emerging beta-lactamases in Gram-negative bacilli. *Int J Antimicrob Agents* 2013; 41(2): 99-109.
10. Poirel L, Heritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 15-22.
11. 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.
12. Studentova V, Papagiannitsis CC, Izdebski R, et al. Detection of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in diagnostic laboratories can be enhanced by addition of bicarbonates to cultivation media or reaction buffers. *Folia Microbiol* 2015; 60(2): 119-29.
13. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen O. Evaluation of Rosco Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *APMIS* 2012; 120(9): 724-32.
14. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67(7): 1597-606.

15. Ellis C, Chung C, Patel SN, Desjardins M, Melano RG, Toye B. OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Ottawa, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013; 76(3): 399-400.
16. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48 producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(2): 168-72.
17. Huang TD, Poirel L, Bogaerts P, Berhin C, Nordmann P, Glupczynski Y. Temocillin and piperacillin/tazobactam resistance by disc diffusion as antimicrobial surrogate markers for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in geographical areas with a high prevalence of OXA-48 producers. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69(2): 445-50.
18. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20(4): 345-9.
19. Navarro-San Francisco C, Mora-Rillo M, Romero-Gomez MP, et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. *Clin Microbiol Infect* 2013; 19(2): E72-9.
20. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol* 2012; 50(12): 3877-80.
21. Ambretti S, Gaibani P, Berlinger A, et al. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist* 2013; 19(3): 212-5.
22. Miriagou V, Tzelepi E, Kotsakis SD, Daikos GL, Casals JB, Tzouveleki 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.
23. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sunsfjord 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 aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(4): 552-6.
24. Balkan I, Aygün G, Aydın S, et al. Blood stream infections due to OXA-48-like carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae*: treatment and survival. *Int J Infect Dis* 2014; 26(9): 51-6.
25. Nazik H, Aydın S, Albayrak R, et al. Detection and spread of OXA-48-producing *Klebsiella oxytoca* isolates in Istanbul, Turkey. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2014; 45(1): 123-9.
26. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, et al. Spread of NDM-1 producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2014; 58(5): 2929-33.
27. Peirano G, Lascols C, Hackel M, Hoban DJ, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* that produce VIMs and IMPs from the SMART surveillance program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014; 78(3): 277-81.
28. Yıldırım I, Ceyhan M, Gür D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of VIM-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. *J Chemother* 2007; 19(4): 467-8.
29. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1 producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(7): 695-6.
30. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Özer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56(5): 2784-5.
31. Alp E, Perçin D, Colakoğlu S, et al. Molecular characterization of carbapenemase-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect* 2013; 84(2): 178-80.
32. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect* 2014; 2(2): 50-1.

