



Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci

^{ID} Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU¹, ^{ID} Harun AKSU¹, ^{ID} Ali AYDIN¹

¹ İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Veteriner Fakültesi, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, İstanbul/TÜRKİYE

◆ Geliş Tarihi/Received: 13.02.2022

◆ Kabul Tarihi/Accepted: 28.02.2022

◆ Yayın Tarihi/Published: 30.06.2022

Bu makaleye atıfta bulunmak için/To cite this article:

Süleymanoglu AA, Aksu H, Aydın A. *Enterobacteriaceae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci. Bozok Vet Sci (2022) 3, (1):12-19.

Özet: Son yıllarda antibiyotik dirençliliği insan ve hayvan sağlığını tehdit eden önemli bir tehdit haline almaktadır. Özellikle çoklu antibiyotik dirençlilik durumu araştırmacılar tarafından sıklıkla bildirilmektedir. Antibiyotik dirençliliği konusundaki önemli bir konu Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL) olup, GSBL grubu çoklu antibiyotik direnci gösteren mikroorganizmalardan oluşmaktadır. GSBL pozitif bakteriler hayvanlarda da mevcut olup gıda aracılığıyla insanları enfekte edebilmektedir. Bu nedenle GSBL konusu hem beşeri tıp hem de veteriner tıbbının ortak konusudur. GSBL bilim dünyası tarafından yakından takip edilmekte ve GSBL sınıflandırılması ile tür analiz çalışmalarını devam ettirmektedir. Nitekim Dünya Sağlık Örgütü, çoklu antibiyotik direnç geliştiren mikroorganizmaların düzenli takip edilmesini önermektedir. GSBL tarama ve doğrulama yöntemleri çeşitli analizler ile yapılabilmektedir. Karbapenem içeren antibiyotikler beşeri hekimlikte kullanılan önemli bir grup olarak bildirilmekte olup, GSBL pozitif bakterilere karşı kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklere olan direnç sürekli artış göstermektedir. Bununla birlikte, GSBL'ye karşı kullanılan karbapenem grubundaki antibiyotik direnci özellikle yoğun bakımdaki hastalarda hayati tehlikeye neden olmaktadır. Son çare antibiyotiği olarak bilinen ve kombine bir şekilde kullanılan kolistin, bu gelişmeler ile tekrardan bilim dünyasında ilgi odağı olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, ESBL, karbapenem ve kolistin antibiyotik grupları ve bu antibiyotik gruplarına karşı gelişen direncin önemini ortaya koymaktır.

Anahtar Kelimeler: *Enterobacteriaceae*, Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, Karbapenem, Kolistin, Çoklu antibiyotik direnci

Extended Spectrum Beta-Lactamase with Carbapenem and Colistin Resistance on *Enterobacteriaceae* Strains

Abstract: Recently, antibiotic resistance has become an important hazard threatening human and animal health. Multiple antibiotic drug resistance is frequently reported by researchers. An important topic on antibiotic resistance is Extended Spectrum Beta-lactamases (ESBL), and the ESBL group consists of microorganisms that show multiple drug resistance. ESBL positive bacteria are also present in animals and can infect humans through food. Therefore, the issue of ESBL is a common subject of both human and veterinary medicine. ESBL is followed closely by the scientific world and continues its classification and species analysis studies. Therefore, the World Health Organization recommends regular follow-up of microorganisms that develop multiple antibiotic resistance, and ESBL screening and verification methods can be performed with various analyzes. Antibiotics containing carbapenems are reported as an important group used in human medicine, and resistance to carbapenem group antibiotics used against ESBL positive bacteria is increasing continually. However, antibiotic resistance in the carbapenem group used against ESBL is life-threatening, especially in patients in intensive care. Colistin is known as the last resort antibiotic and used in combination then once again the focus of attention in the scientific world with these developments. This study aimed to reveal the importance of ESBL, carbapenems, and colistin antibiotic groups and the resistance developing against these antibiotic groups.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, Extended spectrum beta-lactamase, Carbapenem, Colistin, Multi-drug resistance

1.Giriş

Enterobacteriaceae bakterileri orta büyüklükte (0,3-1,0 x 1,0-0,6 µm) Gram- negatif sporsuz, fakültatif anaerop, çomak şeklinde bakterilerdir (1). Söz konusu bakteri familyasındaki mikroorganizmaların geliştirdiği antibiyotik direnç mekanizmaları, önemli halk sağlığı tehditleri meydana getirmektedir. Bu bakteri ailesinde gelişen antibiyotik direnç çeşitlerinin önemli türleri arasında Genişlemiş Spektrumlu β-Laktamaz (GSBL) ve karbapenem direnci yer almaktadır (2). Kolistin adlı antibiyotiğin ise Gram-negatif bakterilerin geliştirdiği çoklu antibiyotik

direncine karşı cevap olarak, günümüzde yeniden kullanımını söz konusu olmuştur (3).

1.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae oldukça önemli Gram-negatif basilleri içeren en büyük bakteri ailesidir. Bu bakteri familyası, doğada birçok ortamda gözlemlenebilen mikroorganizmalardan oluşmakta ve insanlar ile çoğu hayvanın doğal intestinal mikrobiotasında bulunabilmektedir. Bu familyada çok sayıda cins, tür ve alt türler yer almaktadır. Bu cinsler genel olarak; antijenik

karakterine, biyokimyasal özelliklerine, gen sekans analizine ve protein yapılarına bakılarak kategorize edilmektedir. Bu mikroorganizma ailesinin büyüklüğüne rağmen, insanlar için az sayıda patojen bakteri bu ailede yer almaktadır. *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan *Salmonella* spp., *Escherichia coli* (E. coli) O157:H7 gibi bazı bakteriler klinik vakalarda patojen olarak düşünülürken, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ise intestinal mikrobiota bakterileri olup klinik vakalarda fırsatçı mikroorganizma olarak görülebilmektedir (4).

Enterobacteriaceae ailesindeki çoklu antibiyotik direnci; hasta tedavisi, enfeksiyon kontrolü ve toplum sağlığı açısından oldukça önemli bir sorun haline almaktadır. Özellikle GSBL ve karbapenem direnci bu ailede sıklıkla görülmektedir. Bundan dolayı, bu tarz antibiyotik direncine sahip patojenlerin güvenilir ve hızlı bir şekilde tanımlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır (2). *Enterobacteriaceae* ailesindeki antibiyotik dirençliliğinin saptanması için HPA (Sağlık Koruma Örgütü), CDC [Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri] ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) tarafından farklı analiz çeşitleri tavsiye edilmektedir (5, 6, 7).

1.2. Antibiyotik direnci

Antibiyotik direnci; herhangi bir bakterinin, antimikrobiyal preparatın bakterisit ya da mikroorganizmaların üremesini inhibe edici (bakteriyostatik) özelliğinden korunmasıdır. Antibiyotiklere karşı mikroorganizmaların geliştirdikleri direnç mekanizmaları genel olarak 3 şekilde ifade edilmektedir. Bunlardan doğal direnç; mikroorganizmanın sahip olduğu özellikler sonucu ilacın afinite gösterdiği yapıyı taşıyamakta veya ilaç hedefine etki edememektedir. Kazanılmış direnç ise; mikroorganizmaya eskiden etki edebilen antibiyotiklerin artık etki edememesidir ki bu direnç türü diğer direnç türlerine göre daha fazla önem taşımaktadır. Son olarak çevre şartlarına bağlı direnç; normal koşullarda bakteriye karşı etkili olan ilacın, koşullar farklılaştığında etki edeceği bölgeye erişememesi ya da istenilen etkinliği gösterememesi olarak bilinmektedir (8).

Gram-negatif bakterilerde Multi-Drug Resistance (MRD) yani çoklu ilaç direnci global bir tehdit olarak görülmektedir. MRD Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlar, günümüzde enfeksiyon hastalıklarının en çok zorlanılan problemleri arasında yer almaktadır (9).

CDC yılda 2 milyondan fazla insanın dirençli organizmalar ile enfekte olduğunu tahmin etmekte ve bu yüzden yıllık 23.000 insanın hayatını kaybettiğini varsaymaktadır. Ne yazık ki, antimikrobiyal dirençli organizmaların sayısı sürekli artış göstermektedir. 2014 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) dünyanın çoğu bölgesinde oldukça yüksek direnç rakamları bildirmiştir. Örneğin, tüm *Klebsiella*

suşlarının %50'sinden fazlasının üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli olduğu ifade edilmektedir. Nitekim CDC, özellikle karbapenem dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* ile GSBL üreten Gram-negatif basilleri önemli sağlık tehdidi olarak ifade etmektedir (10).

1.3. Antibiyotik dirençli bakteriler ve gıda ürünleri

Dünyamızın artan insan popülasyonu ile beraber insanların yaşam koşullarının gelişmesi sonucu gıda değeri olan hayvanlarda kullanılan ilaçların çeşit ve sayılarındaki gelişmeler, oldukça önem arz etmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda terapötik olarak kullanılan antibiyotik sınıfları büyük oranda benzerlik gösterip, bu sebeple enfeksiyona neden olanlar ile antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkma ve yayılma riski artmaktadır (11, 12).

Et, yumurta, süt, su ve bal gibi gıda ürünlerinde antibiyotik kalıntılarının saptanabilmesinde çok sayıda sebep bulunabilmektedir. Esas nedenleri olarak, hayvanlara yüksek dozda antibiyotik uygulanması ve sonrasında yasal bekleme süresi bitmeden söz konusu hayvanlara ait ürünlerinin insan tüketim için kullanıma sunulması gösterilmektedir (13).

Gıdalar, antimikrobiyel dirençli bakteriler ile farklı yollar ile kontamine olabilmektedir. Antibiyotik dirençli bakteriler suda, toprakta veya insan ile hayvan dışkısında bulunabilmektedir. Tarımsal ürünler, hayvan veya insan dışkısı ile kontamine sular ile sulanması ile kontamine olabilmektedir (14). Gıda ürünleri ilk ürün iken kontamine olabileceği gibi çapraz bulaşma ile sonradan da antibiyotik dirençli bakteriler ile kontamine olabilmektedir (15).

1.4. Beta laktam hakkında genel bilgi

β -laktam grubu antibiyotikler; dört üyeli β -laktam halkasından meydana gelmektedir. β -laktam antibiyotik gruplarındaki farklılıklar, yapılarındaki yan zincir çeşitleri ile farmakokinetik karakterlerinden meydana gelmektedir. Bu antibiyotik grubu; kimyasal yapılarına, aktivite tipine (bakterisit/bakteriyostatik) ve bakteri etki spektrumuna göre sınıflandırılmaktadır (16).

1.5. Beta laktamazlar hakkında genel bilgi

Bir enzim olan beta-laktamazlar; beta-laktam halkasında bulunan amid bağını parçalamak suretiyle beta laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini düşürmektedir. Bir beta laktam olan penisilin Alexander Fleming tarafından keşfedilmiş olmakla birlikte, Abraham ve Chain (17) *E. coli'* den elde ettikleri özütün kısa bir süre içerisinde penisilin etkisini ortadan kaldırdığını bildirmişlerdir.

1.6. GSBL hakkında genel bilgi

Halk sağlığını tehdit eden enfeksiyonlardan çoğunlukla Gram-negatif bakteri türleri sorumlu tutulmaktadır. Beta-laktam antibiyotiklere karşı direncin genel sebebi olan beta-

laktamazlar, söz konusu etkenlerin sağlık problemleri oluşturmadaki en önemli nedeni olarak bilinmektedir. İlk keşfedilen beta-laktamazlar, penisilinler ile birinci kuşak sefalosporinleri etkisizleştirmekle birlikte; sefotaksim, seftazidim gibi geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlıdır. Keşiflerinden sonra geniş spektrumlu beta-laktam preparatların yaygın kullanılmaları ile gelişen mutasyonlar neticesinde “GSBL” olarak isimlendirilen yeni enzimler oluşmuştur (18).

1.7. GSBL pozitif bakterilerin önemi

GSBL pozitif Gram-negatif bakteriler, çeşitli klinik semptomlara neden olabilmektedir. Oluşan klinik vakalarda özellikle üriner sistem enfeksiyonları ile solunum sistemi enfeksiyonları öne çıkmaktadır. Ek olarak sepsis, menenjit, kolanjit gibi çeşitli rahatsızlıklarda görülebilmektedir. GSBL kaynaklı klinik vakalar ile karşılaşan dahiliye uzmanı doktorlar gerekli çıktılardan faydalanamadıkları için tedavi süreçlerinde zorlanabilmektedir. Yoğun bakım ünitelerinde GSBL pozitif bakteriler sayesinde direncin aktarılabilmesi devam eden tedavi süreçlerini olumsuz etkilemektedir (19).

GSBL pozitif bakterilerin tespiti sonrasında, bulunan türlerinin çoğunluğunun *Enterobacteriaceae* olması, bu bakteri ailesinin önemi ifade etmektedir (20). GSBL pozitif ana mikroorganizma grubu *Enterobacteriaceae* familyasıdır. *Enterobacteriaceae*'da bulunan GSBL pozitif önemli bakteriler arasında *E. coli* ve *K. pneumoniae* ilk iki sırada yer almaktadır (21).

GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakterilerin mikrobiyoloji laboratuvarlarında saptanması

Tablo 1: Beta laktamaz enzim çeşitlerinin sınıflandırması

Bush-Medeiros-Jacoby Sistemi	Önemli Alt Gruplar	Ambler Sistemi	Belli Başlı Özellikler
Grup 1 sefalosporinazlar		Grup 1 sefalosporinazlar	Genellikle kromozomal; karbapenemler dışında tüm β-laktamlara direnç; klavulanat ile inhibisyon yok
Grup 2 penisilinazlar (klavulanik aside duyarlı)	2a 2b 2be 2br 2c 2e 2f 2d	A (serin β-laktamazlar) A A A A A A D (oksasilin hidrolizi)	Stafilokok penisilinazları Geniş spektrumlu TEM-1, TEM-2, SHV-1 Genişlemiş spektrumlu: çoğunlukla TEM ve SHV çeşitleri İnhibitörlere dirençli TEM Karbenisilini hidrolize edenler Klavulanat ile inhibe olan sefalosporinazlar Klavulanat ile inhibe olan karbapenemazlar Oksasilini hidroliz edenler (OXA)
Grup 3 metallo β-laktamazlar	3a 3b 3c	B (metalloenzimler) B B	Çinko bağımlı karbapenemazlar
Grup 4 β-laktamazlar		Sınıflandırılmamış	Birçoğu dizi analizi yapılmamış, çeşitli enzimler

büyük önem taşımaktadır. Genel olarak ifade etmek gerekir ise; GSBL pozitif bakterilerin doğrudan kontaminasyon riskinden dolayı gerekli önlemler alınmalı, GSBL pozitif bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda sefalosporin grubu antibiyotikler reçete edilmemeli ve bu enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanılmasının mortalite rakamlarını düşürmesinden ötürü karbapenem kullanımı ve direncinin takibi gerekmektedir (22).

1.8. GSBL grubu bakterilerin sınıflandırması

Gram-negatif bakterilerde β-laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direncin en önemli mekanizması; beta laktamaz üretimi olarak bilinmektedir. İlave olarak kromozomal ya da ekstrakromozomal mekanizmalarda etkin olup, plazmid aracılığıyla aktarılan ekstrakromozomal β-laktamazlar, Gram-negatif bakteriler arasında giderek artmaktadır (23). β-laktamaz enzim çeşitleri Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel ve Ambler moleküler sınıflandırma olmak üzere iki şekilde kategorize edilmektedir (Tablo 1). Bush-Jacoby-Medeiros (24) fonksiyonel sınıflandırmasında; beta laktamaz enzimleri substrat ve inhibitör profilleri gibi fonksiyonel özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Ambler sınıflandırılmasına (24) göre ise; beta laktamaz enzimlerinin protein benzerliğine göre A, B, C, D grupları şeklinde sınıflandırma yapılmaktadır. Sınıf A, C ve D'de yer alan enzimler serin β-laktamaz olmakla beraber, sınıf B grubunda olan enzimler metallo-β-laktamazlardır (24).

GSBL konusu, yalnızca beta-laktam grubu antibiyotikler için sorun olmayıp aynı zamanda florokinolonlar, aminoglikozidler gibi birçok farklı antibiyotik grubunda direnç konusunu da ilgilendirmektedir (25).

1.9. GSBL tiplerine genel bakış

SHV-1 enziminin bir varyantı olan ilk plazmid aracılı beta laktamaz, *K. pneumoniae*'da Almanya'da 1983 yılında bildirilmiştir. Bu buluşu, Fransa'da TEM-1 ve TEM-2 enzimlerinin varyantlarının tespit edilmesi takip etmiştir. Bu gelişmeler üzerine SHV ile TEM Philippon ve ark. (26) tarafından "GSBL" olarak adlandırılmıştır. Başlıca GSBL tipleri, TEM, SHV, OXA, CTX-M, PER, VEB, IBC, BEL, GES, BES, SFO, TLA enzimleridir. TEM ve SHV enzimleri çoğu GSBL'nin kaynağı olarak bilinmektedir (23). GSBL grubundaki enzimlerin sayıları giderek artış göstermekte olup, günümüzde 200'den fazla GSBL enzimi bulunmaktadır. Bu durum ise gelişen mutasyonlara neden olmaktadır (27). GSBL tipleri ve kısa açıklamaları:

●SHV enzim grubu:

K. pneumoniae'da en sık bulunan SHV, ampisilin ve piperasiline karşı antibiyotik direncinin gelişmesine neden olmaktadır. Bu enzim grubu oksimino sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı duyarlıdır (28).

●TEM enzim grubu:

TEM-1 plazmid kökenli en eski enzim olup, penisilin ile birinci kuşak sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminden sorumludur. Bu enzim Gram-negatif bakterilerde en çok sentezlenen enzim olarak bilinmektedir. Bununla beraber söz konusu enzim, ampisiline dirençli *E. coli* suşlarının en sık gözlemlenen nedeni olarak gösterilmektedir (29). TEM-1 enziminin keşfinden bugüne kadar gelişen mutasyonlar sonucu farklı TEM grubu enzimler oluşmuştur (30).

●OXA enzim grubu:

Oksasilini hidrolize edebilmesi ile bu gruba OXA adı verilmiştir. Bu grup enzimler TEM ve SHV enzimlerinden fonksiyonel grup 2d ve moleküler sınıf D'de yer almaları ile farklılık göstermektedir. En yaygın olanı OXA-1 enzimi olup, en sık *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*)'da bulunsa da Gram-negatif birçok bakteride bulunabilmektedir (31).

●CTX-M enzim grubu:

CTX-M grubu GSBL ilk kez *E. coli* bakterisinde bulunmuştur. Söz konusu grup bu keşif sonrası birçok *Enterobacteriaceae* türünde saptanmıştır. Bu grup GSBL bakterileri substrat olarak sefotaksim grubu antibiyotikleri tercih etmektedir (32).

●PER enzim grubu:

PER grubu bir Türk hastadan izole edilen *P. aeruginosa* izolatından bildirilmiştir. PER-1 enzimi penisilin ve sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı dirençli olup klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (33). İlave olarak, PER

enzimleri ile TEM ve SHV tipi enzimler ile DNA baz dizilimleri açısından %25-27 düzeyinde benzerlik göstermektedir (34).

●VEB enzim grubu:

VEB-1 ilk kez bir *E. coli* suşunda keşfedilmiş olup, seftazidim sefotaksim ve aztreonam antibiyotiklerine karşı yüksek direnç ve klavulanik asite karşı duyarlılık göstermektedir (35).

●Karbapenemazlar:

Karbapenemazlar; karbapenemleri hidrolize eden enzim grubu olarak bilinmektedir (36).

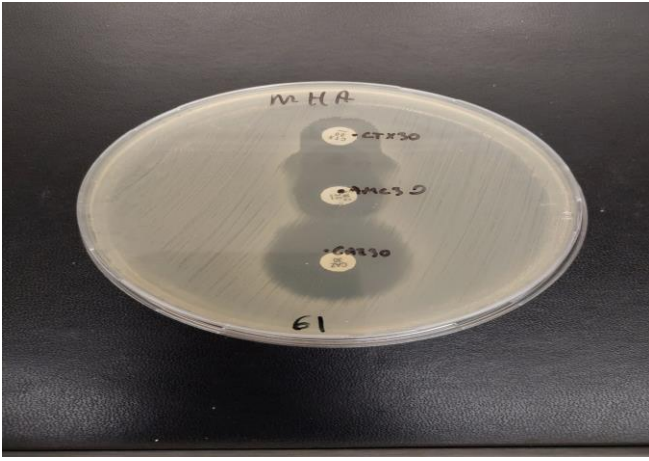
1.10. GSBL bakterilerinin teşhis yöntemi

GSBL varlığının saptanması ile enzim çeşitlerinin belirlenmesi, özellikle enfeksiyon kontrolü bakımından tavsiye edilmektedir. *Enterobacteriaceae* familyasındaki bakteriler için GSBL saptanmasında önerilen yol, ilk olarak oksimino-sefalosporinlere duyarlı olmama özelliğinin tespit edilmesidir. Sonraki aşamalarda ise fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri gerçekleştirilmektedir (37, 38).

Enterobacteriaceae familyasındaki bakterilerde GSBL tarama testleri için önerilen yöntemler; sıvı dilüsyon, agar dilüsyon, disk difüzyon veya otomatize sistemlerdir.

Enterobacteriaceae familyasında EUCAST (38)'e göre GSBL tarama yöntemlerinde bakteriler sınıflandırılarak 2 gruba ayrılmıştır. İlk grupta *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Raoultella spp.*, *P. mirabilis* bulunmaktadır (39, 40). İkinci grupta ise *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Providencia*, *Citrobacter freundii* bulunmaktadır. Buradaki sınıflandırmanın nedeni olarak; ikinci grup bakteri topluluğunda deprese kromozomal AmpC β-laktamaz üretimi ile sefalosporin grubu antibiyotiklere karşı direnç yol açan mekanizmalara daha sık rastlanması gösterilmektedir (41).

GSBL tarama testleri sonrası doğrulama yöntemleri kullanılmaktadır. Genel olarak bu doğrulama yöntemleri fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki kategoriye ayrılabilir (38). Fenotipik yöntemler içerisinde kombinasyon disk testi (KDT), çift disk sinerji testi (ÇDS) (şekil 1), GSBL gradient strip testi ve sıvı mikrodilüsyon testi yer almaktadır. Bunların dışında biyokimyasal (kolorimetrik) yöntemlerde bulunmaktadır (40, 41, 42).



Şekil 1: GSBL pozitif *E.coli* suşunun çift disk sinerji testi

1.11. Çift disk sinerji testi ile çeşitli otomatize sistemlerin karşılaştırılması

GSBL üretimini belirlemeye yönelik analizlerle ilgili yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır. Çeşitli otomatize sistemler (43, 44) ve Çift Disk Sinerji (ÇDS) testi kullanılarak 150 enterik bakteri ile yapılmış karşılaştırmalı bir çalışmada, moleküler metotlar referans olarak alındığında, ÇDS testi, E-test, Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD), VITEK 2 (bioMérieux, Fransa) ve MicroScan WalkAway-96 System (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA, ABD), yöntemlerinin GSBL saptanmasında duyarlılıkları sırasıyla, %97; %72,7; %100; %84,5; %98,6; %94,4 ve %98,6 olarak bulunmuş olup ÇDS testinin rutin laboratuvarlar için daha uygun bir yöntem olabileceği sonucuna varılmıştır (43, 44).

GSBL tiplerinin tam olarak tanımlanıp doğrulanabilmesi için moleküler genetik analiz metodlarına ihtiyaç duyulmaktadır. GSBL'nin keşfi sonrası ilk zamanlarda izoelektrik noktalarının belirlenmesi tiplendirme için yeterli olarak görülmüş olsa da (45), günümüzde genetik yöntemler çeşitlenmiş olup Polimer Zincir Reaksiyonundan (PZR) tüm gen sekans analizine kadar çeşitli yöntemler doğrulama metodu olarak kullanılabilir (38, 46).

1.12. Karbapenem

Karbapenem grubu antibiyotikler, toprakta bulunabilen *Streptomyces cattleya* adlı mantar türünden üretilen bir antibiyotik olan tienamisin türevleridir. 1. pozisyonda sülfür yerini alan bir karbon atomu ve beş üyeli tiyazolidin halkasında C2 ve C3 arasında bir çift bağ olması ile penisilin grubu antibiyotiklerden farklılık göstermektedir (47).

1.13. Karbapenem önemi

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerden çok MDR ve GSBL üreten bakteri suşlarının ortaya çıkması ve yayılması, dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi oluşturmaktadır. Bu durum halihazırda

kullanılmakta olan antibiyotiklerin etkinliklerine karşı büyük bir tehdit oluşturmaktadır (48).

1.14. Karbapenamazlar

Karbapenamazlar; penisilinleri, sefalosporinlerin çoğunu, değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır (49). Karbapenamazların moleküler ailesi; New Delhi metallo β -laktamaz (NDM), çeşitli metallo beta laktamazlar [imipenemaz (IMP) Verona Integron Mediated metallo β -laktamaz (VIM)] ile serin karbapenamazlardan (*K. pneumoniae carbapenemase* (KPC) ve OXA tipi karbapenamazlardan) oluşmaktadır (50).

Karbapenamaz türlerinin görülme sıklığı sürekli artmakta olup, daha çok KPC endemik özelliği olmasıyla öne çıkmakta ve endemik olarak ABD, Latin Amerika, İsrail ve Yunanistan'da daha çok tespit edilmektedir (51).

Enterobacteriaceae üyelerinde karbapenamaz üretiminin saptanması için önerilen yöntemler arasında; fenotipik karbapenamazların aranacağı testler, kombinasyon disk testi, karbapenem inaktivasyon testi, kontrol suşları ile test, biyokimyasal testler, lateral akım yöntemleri, MALDI-TOF ile karbapenem hidrolizinin saptanması yer almaktadır (38).

1.15. Karbapenem direnci saptanmasında genotipik yöntemler

Karbapenamaz şüpheli örneklerin kesin tanısında, moleküler genetik yöntemler "Altın Standart" olarak kabul edilmektedir (52). Genetik analiz metodlarında sıklıkla PZR'dan faydalanılmaktadır. Doğrulama için gen sekans analiz yöntemine de başvurulabilmektedir (53, 54).

1.16. Kolistin

Kolistin; *Bacillus polymyxa* subspecies *calistimus*'tan elde edilmiş bir antibiyotiktir. (55). Kolistin 1940'lı yıllarda keşfedilmiş olup polimiksin grubu üyesidir ve polimiksin E olarak isimlendirilmektedir. Ayrıca kolistin, polipeptit yapılı antibiyotik olarak bilinmektedir. Kolistin heptopeptid halka içeren 10 amino asitten oluşan amid bağından ve 2-4 aminobütirik asit ile bağlı yağ asit kuyruğundan meydana gelmektedir (55, 56).

1.17. Kolistinin önemi ve riskler

Kolistin'in etki spektrumu oldukça dardır. Çoğu *Enterobacteriaceae*'ye (*Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp. ile *Morganella morganii*, dışında) ve *Acinetobacter* spp. ve *P. aeruginosa* karşı oldukça etkilidir. Buna karşın kolistin, Gram-pozitif veya Gram-negatif koklara, Gram-pozitif basil, çoğu anaerobik bakteri, mantar ve parazite karşı etkili göstermemektedir (57).

Kolistin 1950-1980 yılları arasında tedavi amacıyla sıklıkla kullanılmıştır. 2000'li yıllarda ise nefrotoksik yan

etkilerinden dolayı, kullanımı sadece kistik fibrozlu hastalarda çoklu ilaç dirençli Gram-negatif bakteriler ile oluşan akciğer enfeksiyonları ile sınırlı kalmıştır (58). Ancak, kolistin geçmiş on yılda son çare antibiyotığı olarak; çoklu antibiyotik direncine sahip Gram-negatif bakterilerin bulunduğu enfeksiyonlarda tekrardan kullanılmaya başlanmıştır (59).

Kolistin kullanımında farmokokinetik/farmokodinamik etkinliği ile alakalı önemli veriler olsa da söz konusu antibiyotığın terapötik kullanımında alternatif çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanılacak antimikrobiyal madde eksikliği veya çoklu antibiyotik direncine karşı yeni ürünlerin maliyeti etkili olmaktadır. İlave olarak, kolistin önemli yan etkileri olması da kullanımını sınırlandırmaktadır (60).

Karbapenemlere ve sefalosporinlere karşı direnç global düzeyde artarken kolistin son çare antibiyotiklerden biri olarak kabul edilerek DSÖ'nün insan tıbbi için kritik olarak önemli antimikrobialeri listesinde yer almaktadır (3).

1.18. Kolistin direncinin tespiti

Moleküler özellikleri sebebiyle kolistin diğer antibiyotikler gibi duyarlılık testlerinde güvenilir veriler sunmamaktadır (61). Bu dezavantajlı durumun sebebi, kolistin büyük molekül yapısı sebebiyle agara diffüze olmaması sonucunda disk diffüzyon çaplarının güvenilirliğinin az olması şeklinde gösterilmektedir (62, 63). Bu özelliği ile kolistin direncinin araştırılmasında, disk diffüzyon yöntemi uygun bulunmamaktadır (63). Kolistin moleküler yapısına bağlı olarak, kolistin için disk difüzyon testi yerine, tedavide bu antibiyotığın kullanılmasından önce kesin Minimal İnhibisyon Konsantrasyon (MİK) değeri ölçülmesini gerektiği ifade edilmektedir (64). Kolistin MİK değerinin saptanması için altın standart olarak belirlenen metot olarak ise sıvı mikrodilüsyon yöntemi gösterilmektedir (65). Kolistin direnci moleküler genetik yöntemler ile de araştırılabilmektedir. Kolistin direncinin araştırılmasında PZR ve tüm genom sekansı gibi teknikler kullanılabilir (66, 67, 68).

2. Sonuç

Antibiyotik direnci, dünya sağlığı için oldukça önemli bir konu olup, önemi günden güne artmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı geliştirdikleri ve geliştirmekte oldukları dirençleri, hem beşeri hem de veteriner tıp dünyası tarafından yakından takip edilmesi gerekmektedir. Hayvanlardan insanlara doğrudan ya da gıda aracılığı ile geçebilen çoklu antibiyotik dirençli bakteriler, gelecekte ciddi halk sağlığı problemlerine neden olabilecektir. Bu konu dâhilinde, GSBL ve bu gruba karşı kullanılan karbapenemlere karşı gelişen direnç durumu konunun ciddiyetini açıkça göstermektedir. Karbapenem direncine

karşı kullanılan son çare antibiyotığı olarak adlandırılan kolistin kullanımını aslında mecburiyetten ortaya çıkarmıştır. Önemli yan etkileri bulunan kolistin, çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı kullanabileceğimiz imkanların kısıtlılığından dolayı, tekrar kullanılmak durumunda kalmıştır. *Enterobacteriaceae* grubunda yer alan mikroorganizmalarda antibiyotik gelişiminin takip edilmesi ve elde edilen sonuçlara göre gerekli önlemlerin alınması, ülkemiz toplum ve halk sağlığı ile hayvan sağlığı açısından hayati öneme sahip bir durum olarak değerlendirilmektedir.

Kaynaklar

1. Topçu AW, Söyletir G, Doganay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Üçüncü Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2008; pp. 2126-2135.
2. Ofer-Friedman H, Shefler C, Sharma S, Tirosh A, Tal-Jasper R, et al. Carbapenems Versus Piperacillin/Tazobactam for Bloodstream Infections of Nonurinary Source Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae. *Infection Control Hospital Epidemiology* 2015; 36: 981-5. doi: 10.1017/ice.2015.101.
3. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomycin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clinical Microbiology and Infection* 2015; 10: 899-905. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.05.022>.
4. Murray RP, Rosenthal KS, Pfaller AM. Enterobacteriaceae in Bacteriology. *Medical Microbiology* 2009; 25: 257-270.
5. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How?. *Virulence* 2017; 8: 417-426. doi: 10.1080/21505594.2016.1255381.
6. Capone A, Giannella M, Fortini D, Lappa A, Venditti M, et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae infection accounts for an excess of mortality. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 23-30. doi: 10.1111/1469-0691.12070.
7. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews* 2007; 20: 440-458.
8. Ustaçelebi Ş. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1999; 509-511.
9. Lukac PJ, Bonomo RA, Logan LK. Extended-Spectrum -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat. *Clinical Infection Disease* 2015; 60: 1389-1397. doi: 10.1093/cid/civ020.
10. Forster CS, Courter J, Jackson EC, Mortensen JE, Haslam DB. Frequency of Multidrug-Resistant Organisms Cultured From Urine of Children Undergoing Clean Intermittent Catheterization. *Journal of Pediatric Infectious Diseases Society* 2016; 6: 20. doi: 10.1093/jpids/piw056.
11. Prescott JF. Antimicrobial use in food and companion animals. *Animal Health Research Reviews* 2008; 2: 127-133.
12. Magiorakos AP. Joint opinion on antimicrobial resistance (AMR) focused on zoonotic infections. *EFSA Journal*, 2009; 7: 1372.
13. Aydın A, Sudağıdan M. Büyüyen küresel tehdit: antibiyotik direnci. Büyüenal SK, editör. Gıdanın Geleceğini Riske Eden Güncel Etmenler Tek Tıp Tek Sağlık Konsepti Yaklaşımı. Birinci Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2022. p.8- 17.
14. Bergogne-Bérézin, E. Who or what is the source of antibiotic resistance? *Journal of Medical Microbiology* 1997; 46: 461-47.
15. Walsh C, Duffy G, Nally P, O'Mahony R, McDowell DA, et al. Transfer of ampicillin resistance from Salmonella Typhimurium DT104 to Escherichia coli K12 in food. *Letters in Applied Microbiology* 2008; 46: 210-215.

16. Murray BE, Anderson K, Arnold K, Barlett J, Carpenter C. Erratum. *Clinical Infectious Diseases* 2005; 41: 279. doi.org/10.1086/430468.
17. Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora Dergisi* 1997; 2: 3-18.
18. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public health concern. *The Lancet Infectious Diseases* 2008; 8: 159-166. doi: 10.1016/S1473-3099(08)70041-0.
19. Ramphal R, Ambrose GP. Extended-Spectrum β -Lactamases and Clinical Outcomes: Current Data, *Clinical Infectious Diseases*, 2006; 42: 164–172, https://doi.org/10.1086/500663.
20. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 144–153. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x.
21. Brolund A, Edquist PJ, Mäkitalo B, Olsson-Liljequist B, Söderbloma T, et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. *Clinical Microbiology and Infection* 2014; 20: 344-352. doi: 10.1111/1469-0691.12413.
22. Paterson DL. Recommendation for treatment of severe infections caused by Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). *Clinical Microbiology and Infection* 2000; 6: 460-463. doi:10.1046/j.1469-0691.2000.00107.x.
23. Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine* 2008; 28: 401-412. doi: 10.3343/kjlm.2008.28.6.401.
24. Bush K, Jacoby AG. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010; 969–976. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
25. Tolun V, Küçükbaşmacı O, Törümküney-Akbulut D, Catal C, Anđ-Küçükler M, Anđ O. Relationship between ciprofloxacin resistance and extended-spectrum beta-lactamase production in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains. *Clinical Microbiology and Infection* 2004; 10: 72-75. doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.00723.x.
26. Canton R, Coque TM. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion In Microbiology* 2006; 9: 466-475. doi: 10.1016/j.mib.2006.08.011.
27. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18: 657-686. doi: 10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
28. Stürenburg E, Mack D. Extended spectrum beta-lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection* 2003; 47: 279-295. doi: 10.1016/s0163-4453(03)00096-3.
29. Gür D. ESBL'ların genel özellikleri ve ESBL tipleri, yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 2004.
30. Canton R, Morosini MI, Martin O, Maza S. IRT, and CMT beta-lactamases and inhibitor resistance. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 53-62 doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01849.x.
31. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clinical Microbiology Reviews* 1995; 8: 557-84. doi: 10.1128/CMR.8.4.557.
32. Vincent JL. *Yearbook of Intensive Care and Emergency Medicine* 1999. Springer Science & Business Media, 2013; pp. 124-125.
33. Nordman P, Ronco E, Naas T, Dupont C, MichelBriand Y, Labia R. Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993; 37: 962–969. doi: 10.1128/AAC.37.5.962.
34. Nordmann P, Naas T. Sequence analysis of PER-1 Extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994; 38: 104-114. doi: 10.1128/AAC.38.1.104.
35. Poir L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999; 43: 573-581. doi.org/10.1128/AAC.43.3.573.
36. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology Infection* 2002; 8: 321–331. doi.org/10.1046/j.1469-0691.2002.00401.x.
37. Cockerill FR, Patel JB, Alder J, Hardy DJ, Zimmer BL, et al. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first informational Supplement. CLSI documents 2011; 144-147.
38. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology* 2012; 50: 3877-3880.
39. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 18: 657-86. doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005.
40. Biedenbach DJ, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Analysis of *Salmonella* spp. with resistance to extended-spectrum cephalosporins and fluoroquinolones Antimicrobial Surveillance Program (1997- 2004), *Diagnostic Microbiology and Infection Disease* 2006; 54: 13-21.
41. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of Extended-Spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection* 2008; 14: 90-103. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x.
42. Platteel TN, Cohen Stuart JW, de Neeling AJ, Vorts GM, Scharringa J, et al. Multi-centre evaluation of a phenotypic Extended Spectrum β -lactamase detection guideline in the routine setting. *Clinical Microbiology and Infection* 2013; 19: 70-76. doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03739.x.
43. Wiegand I, Geiss HK, Mack D, Stürenburg E, Seifert H. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. *Journal of Clinical Microbiology* 2007; 45: 1167- 1174. doi.org/10.1128/JCM.01988-06.
44. Sanguinetti M, Posteraro B, Spanu T, Ciccaglione D, Romano L, Fiori B. Characterization of clinical isolates of Enterobacteriaceae from Italy by the BD Phoenix extended-spectrum beta-lactamase detection method. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; 41: 1463-1468. doi: 10.1128/JCM.41.4.1463-1468.2003.
45. Randall LP, Kirchner M, Teale CJ, Coldham NG, Liebana E, et al. Evaluation of CHROMagar CTX, a novel medium for isolating CTX-M-ESBL positive Enterobacteriaceae while inhibiting AmpC- producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2009; 63: 302-308. doi.org/10.1093/jac/dkn485.
46. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews* 2001; 14: 933-951. doi.org/10.1128/CMR.14.4.933-951.2001.
47. Yohei D. Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Doripenem, and Aztreonam. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases 2015; 22: 285-290.

48. Patel G, Bonomo AR “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontier in Microbiology* 2013. doi: 10.3389/fmicb.2013.00048.
49. Cantón, R, Carmeli Y, Giske G, Nass, Miriagou V. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* 2012; 18: 413-431, doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03821.x.
50. Kumarasamy KK, TolemanMAM, Walsh RT, Bagaia J, Butt F, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infection Diseases* 2010; 10: 597-602. doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
51. Logan LK, Weinstein RA. The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: The impact and evolution of a global menace. *The Journal of Infectious Diseases* 2017; 215: 28-36. doi.org/10.1093/infdis/jiw282.
52. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C G, Poirel L. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infections* 2012; 18: 432-438 doi: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.
53. Avlami A, Bekris S, Gantries G, Kraniotaki E, Paniara O, et al. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 83: 185-187. doi.org/10.1016/j.mimet.2010.08.014
54. Poirel L, Walsh RT, Cu villier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 2011; 70: 119-23. doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002.
55. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2012; 10: 917-934.
56. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Dokuzuncu Baskı. İzmir: Fakülteler Kitapevi, 2009; pp. 428-429.
57. Boisson M, Gregoire N, Couet W, Mimoz O. Colistin in critically ill patients. *Minerva Anesthesiology* 2013; 79: 200-208.
58. Akalin H. Kolistin. *Ankem* 2007; 21: 26-28.
59. WHO Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR) Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. Third edition. Geneva: WHO Press, 2011; p. 7-8.
60. Lenhard JR, Bulman ZP, Tsuji BT, Kaye KS. Shifting gears: the future of polymyxin antibiotics. *Antibiotics*, Basel, 2019; 8: 42. doi.org/10.3390/antibiotics8020042.
61. Giske CG, Kahlmeter G. Colistin Antimicrobial Susceptibility Testing—Can the Slow and Challenging Be Replaced by the Rapid and Convenient?. *Clinical Microbiology and Infection* 2018; 24: 93-94. doi.org/10.1016/j.cmi.2017.10.007.
62. Stürenburg E, Sobottka I, Noor D, Laufs R, Mack D. Evaluation of a new cefepime-clavulanate ESBL Etest to detect extended-spectrum β -lactamases in an Enterobacteriaceae strain collection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2004; 54: 134-138. doi.org/10.1093/jac/dkh274.
63. Hindler JA, Humphries RM. Colistin MicVariability by Method for Contemporary Clinical Isolates of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 2013; 51: 1678-1684. doi.org/10.1128/JCM.03385-12.
64. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Bailey & Scott’s Diagnostic Microbiology*. Baltimore: Mosby Year Book, 1994; pp.362-387.
65. Leclercq R, Canton R, Brown JDF, Giske GC, Heisig P, MacGowan PA, et al. Eucast Expert Rules in Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Infections* 2013; 19: 141-160 doi: 0.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
66. Humphries RM, Ambler J, Mitchell LS, Castanheira M, Dingle T, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests, *Journal of Clinical Microbiology*, 2018; 56.
67. Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. *Eurosurveillance* 2018; 23. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672.
68. Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agersø Y, et al. Genotyping using whole genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68: 771-777. doi: 10.1093/jac/dks496.