

Meropenem E-test, *Bacteroides fragilis* Suşlarında Karbapenem Direnç Geni *cfiA* Varlığını Tahmin Etmede Kullanılabilir mi?*

Can Meropenem E-test be Used to Estimate the Presence of Carbapenem Resistance Gene *cfiA* Among *Bacteroides fragilis* Strains?

Nurver TOPRAK ÜLGER, Arzu İLKİ, Nilay ÖZEL, Neşe BALKAN, Güner SÖYLETİR

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.
Marmara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Istanbul, Turkey.

* Bu çalışma, 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi (15-19 Haziran 2010, Ankara)'nde poster bildirisi olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi (Received): 02.01.2011 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 14.02.2011

ÖZET

Normalde kolon florasında bulunan *Bacteroides fragilis*, anaerob enfeksiyonlarda en sık izole edilen patojen olup, antibiyotiklere diğer anaeroplardan daha fazla direnç göstermektedir. Karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri ve metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotikler *Bacteroides* spp. üzerine etkili olmakla birlikte, son zamanlarda bu antibiyotiklere karşı direnç geliştiren izolatlar da bildirilmiştir. Karbapenemlere direnç, *cfiA* geni tarafından kodlanan metallo-beta-laktamaz aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Anaerob bakterilerin duyarlılık testleri için agar dilüsyon yöntemi kullanılmakta; bunun yanı sıra morbidite ve mortalitesi yüksek, yaşamı tehdit eden enfeksiyonlara neden olan anaeroplarda, alternatif yöntem olarak E-test önerilmektedir. Bu çalışmada, *B. fragilis* suşlarında karbapenem direncinin belirlenmesi ve *cfiA* gen varlığının tahmin edilmesinde meropenem E-test yönteminin değerinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya, laboratuvarımızda daha önceden, 16'sı dışkı olmak üzere 47 klinik örnekten izole edilen ve tanımlanan toplam 63 *B. fragilis* suşu alınmıştır. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MIK) değerleri meropenem E-test (AB Biodisk, İsveç) ile, *cfiA* geni varlığı ise "in house" polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılmıştır. İzolatlarda meropenem MIK aralıkları $< 0.002 - > 32 \mu\text{g/ml}$ olarak saptanmış ve direnç oranı %9.5 (6/63) olarak izlenmiştir. Suşların %33 (21/63)'ünde *cfiA* geni varlığı gösterilmiştir. Direnç geni varlığı ile yüksek MIK değerleri (MIK $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmuştur ($p < 0.0001$). Çalışmamızda, suşlarda saptanan *cfiA* pozitiflik oranının diğer ülke verilerine göre belirgin şekilde yüksek olması, hastanemizde karbapenemlerin sık

İletişim (Correspondence): Dr. Nurver Toprak Ülger, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Haydarpaşa Kampüsü, İstanbul, Türkiye. Tel (Phone): +90 216 414 4732, E-posta (E-mail): nurverulger@yahoo.com

kullanılmasına bağlanabilir. Elde ettiğimiz sonuçlar, *B. fragilis* izolatlarında muhtemel *cfiA* gen varlığını tahmin etmede ve dirençli suşları saptamada meropenem E-testinin yararlı olduğunu göstermektedir.

Anahtar sözcükler: *Bacteroides fragilis*; metallo-beta-laktamaz; *cfiA* geni; meropenem; E-test.

ABSTRACT

Bacteroides fragilis, which is found in normal colon flora, is the most commonly encountered pathogen in anaerobic infections and more resistant to antimicrobial agents than the other anaerobes. Limited number of antibiotics; such as carbapenems, beta-lactam/beta-lactamase inhibitors and nitroimidazoles are the most effective antibiotics against *Bacteroides*, however resistant isolates to these antimicrobials have been reported recently. Resistance against carbapenems occurs due to a metallo-beta-lactamase enzyme expressed by *cfiA* gene. While agar dilution method is used to test the antimicrobial susceptibility of anaerobic organisms, E-test is recommended for susceptibility testing of anaerobes associated with life-threatening infections with high mortality and morbidity. In this study, meropenem E-test was used to determine the carbapenem resistance of *B. fragilis* strains and to estimate the presence of *cfiA* gene. A total of 63 *B. fragilis* strains that were previously isolated from clinical samples (of which 16 were from stool samples) in our laboratory, were enrolled in the study. Minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined by meropenem E-test (AB Biodisk, Sweden) and presence of *cfiA* genes were investigated by in-house polymerase chain reaction. The MIC ranges of meropenem were $< 0.002 - > 32 \mu\text{g/ml}$ and the resistance rate was 9.5% (6/63). Thirty-three percent (21/63) of strains harboured *cfiA* gene. A statistically significant relation ($p < 0.0001$) was determined between presence of *cfiA* gene and high MIC value ($\text{MIC} \geq 0.5 \mu\text{g/ml}$). The proportion of *cfiA*-positive isolates detected in this study was substantially higher than that reported in other countries. This might be attributed to the frequent use of carbapenems in our hospital. The results of this study indicated that meropenem E-test method could be useful to estimate the presence of *cfiA* gene in *B. fragilis* strains and thus to detect the resistant strains.

Key words: *Bacteroides fragilis*; metallo-beta-lactamase; *cfiA* gene; meropenem; E-test.

GİRİŞ

Anaerop bakteriler ciddi seyirli, hatta ölümcül enfeksiyonlara neden olabilen mikroorganizmalardır¹. Üretilmeleri yoğun emek, özel koşul ve düzenekleri gerektiren bu bakterilerin kültürü ve antibiyotik duyarlılıkları gerek dünyada, gerekse ülkemizde çok az merkezde yapılmaktadır. Genellikle anaerop enfeksiyon şüphesinde ampirik tedavi uygulanmaktadır. Ancak anaeroplarda antibiyotiklere artan oranda direnç gelişmesi nedeniyle, ampirik tedavide yetmezlikler görülebilmektedir. Tedavinin başarılı olabilmesi için, anaerop bakteriler de dahil etken mikroorganizmaların tanımlanması, antibiyotik duyarlılıklarının bilinmesi gerekmektedir².

Anaerop patojenler arasında *Bacteroides* türleri birinci sırayı almaktadır ve bunların içinden en fazla *B. fragilis* izole edilmektedir. Normalde *Bacteroides* türleri kolon florasının büyük bir kısmını oluşturmakta, az oranda kadın genital organlarında, ağız boşluğu ve üst solunum yolu florasında bulunmaktadır. Ancak, genellikle bir gastrointestinal veya genitoüriner sistem operasyonu, abdominal travma, apandisit perforasyonu veya divertikülit sonrasında *Bacteroides* türleri, diyafram altı enfeksiyonlara neden olabilmekte, bakteremiye yol açabilmektedir¹.

Bacteroides türlerinin diğer bir önemi, antibiyotiklere diğer anaeroplara göre daha fazla direnç göstermeleridir. Bu bakterilerin, karbapenemler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, metronidazol gibi sınırlı sayıda antibiyotiğe duyarlı oldukları bilinmektedir. Ancak son dönemlerde *Bacteroides* suşlarının bu antibiyotiklere de direnç geliştirdiklerine dair çalışmalar bildirilmiş ve karbapenemlere dirençli suşların *cfiA* geni ile kodlanan metallo-beta-laktamaz yapısında karbapenemaz enzimi ürettikleri gösterilmiştir³. Karbapenemaz enziminin sadece karbapenemleri değil, aynı zamanda diğer beta-laktam grubu antibiyotikleri de inaktive ettiği tespit edilmiştir. Direnç geni *cfiA*, kromozom içinde tek başına iken sessiz kalabilmekte veya az oranda eksprese olabilmektedir. Ancak, hemen önünde mobil bir gen olan IS elementinin yer alması halinde direnç geni ekspresyonu daha fazla artmaktadır^{4,5}.

Anaerob bakterilerin duyarlılıklarını belirlemede "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)", referans yöntem olarak agar dilüsyon yöntemini kabul etmiştir⁶. Zahmetli, pek de pratik olmayan bu yöntemin daha ziyade belirli zaman dilimlerinde yapılacak, antibiyotiklere direnç gelişiminin izlendiği sürveyans çalışmalarında kullanılması uygun görülmektedir. Bunun yanı sıra, yaşamı tehdit eden enfeksiyonların varlığında, kan gibi önemli klinik örneklerden *Bacteroides*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Clostridium* türleri, *Bilophila wadsworthia* ve *Stutterella wodworthensis* gibi virülansı yüksek bakterilerin izole edildiği durumlarda, agar dilüsyon yöntemine alternatif olarak "Food and Drug Administration (FDA)" tarafından kabul edilen E-test önerilmektedir⁷.

Merkezimizde belli aralıklarla yapılan agar dilüsyon yöntemiyle elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçlarına göre; imipenem MİK değerlerinin belirli konsantrasyonlarda toplandığı, dirençli suşlar ile duyarlılar arasında keskin bir MİK farklılığının olduğu, *cfiA* geni bulunmasına karşın sadece IS elementi olanlarda fenotipik direnç görüldüğü saptanmıştır. Buna karşın meropenem MİK değerleri imipenem MİK değerlerine göre daha yüksek bulunmuş, MİK değerlerinde geniş bir dağılım aralığı gözlenmiş, IS elementi olsun veya olmasın *cfiA* varlığında MİK değerleri daha yüksek bulunmuştur. Bu gözlemlerimizden yola çıkarak çalışmamızda, meropenem E-test uygulanması halinde MİK değerlerinin agar dilüsyon yöntemiyle alınan sonuçlara göre benzer geniş bir dağılım gösterip göstermeyeceği incelenmiş, ayrıca meropenem E-testinin *B.fragilis* suşlarında karbapenem direncini belirlemede ve *cfiA* gen varlığını tahmin etmede yardımcı olup olmayacağı araştırılmıştır. Dirençli suşu tespit etmenin ve *cfiA* gen varlığını tahmin etmenin, *Bacteroides* türleriyle gelişen enfeksiyonların tedavisinde başarı getireceği varsayımıyla bu çalışma planlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, 16'sı dışkı olmak üzere çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş, tanımlanmış ve stoklanmış olan toplam 63 *B.fragilis* suşu alındı.

Bakterilerin imipenem ve meropeneme duyarlılıkları, CLSI'nın anaerob bakteriler için önerdiği agar dilüsyon yöntemiyle çalışıldı⁶. Aynı suşlara meropenem E-testi (AB Biodisk, İsveç) de uygulandı. Duyarlılık testlerinde ATCC 25285 *B.fragilis* suşu kontrol olarak kullanıldı.

Bakteri DNA'sının elde edilmesi amacıyla bakteri kültüründen 4-5 koloni alınarak, DNaz, RNaz bulundurmayan 200 µl su içinde süspanse edildi. Ardından 20 dakika 95°C'de ısıtıldı ve 12.000 rpm'de santrifüj edilerek üst kısım kullanıldı⁵.

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için uygun primerler (*cfiA* F:5'-TTTCCCTGTGCGAGT-TATGG-3' ve *cfiA* R: 5'- TTTCCCTGTGCGAGTTATGG-3') kullanılarak *cfiA* genleri amplifiye edildi. Döngüler; 94°C'de 2 dakika, 35 döngü (94°C'de 45 saniye, 51°C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye) ve 72°C'de 2 dakika olarak uygulandı. Elde edilen PCR ürünleri etid-yum bromür içeren %2'lik agaroz jelde ve 1 x TBE tamponu içinde 90 V'de bir saat yürütüldü; oluşan bantlar UV ışığı altında gözlemlendikten sonra yorumlandı⁵. Kontrol olarak, daha önce laboratuvarımızda tanımlanan *cfiA* geni pozitif *B.fragilis* suşu kullanıldı.

İstatistiksel değerlendirmede Pearson ki-kare analiz yöntemi kullanıldı; p< 0.05 değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Agar dilüsyon yöntemine göre; imipenem MİK değerleri ≤ 0.125 ile 32 µg/ml dilüsyonlarında, meropenem MİK değerleri de ≤ 0.125 ile 64 µg/ml dilüsyonlarında yer almıştır. Tüm suşların %6.3 (4/63)'ü imipeneme, %9.5 (6/63)'i meropeneme dirençli bulunmuştur. Her iki antibiyotiğe dirençli olan suşlarda *cfiA* direnç geni saptanmıştır. İmipenem MİK dilüsyonları, %86 oranında ≤ 0.5 µg/ml değerlerinde birikirken, meropenem MİK değerleri daha yaygın bir dağılım göstermiştir (Tablo I).

Meropenem E-test sonuçlarına göre; MİK değerleri < 0.002 - > 32 µg/ml arasında değişiklik göstermiştir (Tablo II). Suşların %33 (n= 21)'ünde *cfiA* geni gösterilmiş olmakla beraber, direnç oranı (≥ 16 µg/ml) %9.5 bulunmuştur. Direnç geni varlığı ile MİK değerleri arasında bir bağlantı araştırıldığında, "MİK ≥ 0.5 µg/ml" değerlerine sahip suşlarda (n= 16) *cfiA* geninin var olma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuş (p< 0.0001); benzer şekilde MİK değerleri 0.5'ten az olduğunda *cfiA* geninin negatif olma olasılığı da anlamlı (p< 0.0001) bulunmuştur (Tablo III).

TARTIŞMA

Anaerob bakterilerin 1970'li yılların başından beri antibiyotiklere artan oranda direnç geliştirdikleri, direncin özellikle *Bacteroides* türleri arasında yaygın görüldüğü bildirilmiştir³. Bu bakterilerin direnç mekanizmalarından birisi beta-laktamaz üretimidir. *Bacteroides*

Tablo I. Agar Dilüsyon Yöntemiyle *cfiA* Geni Varlığına Göre Suşların İmipenem ve Meropenem MİK Dağılımının Karşılaştırılması

Direnç geni	Antibiyotik	Suşların MİK (µg/ml) değerlerine göre dağılım sayıları									
		≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64
<i>cfiA</i> pozitif (n= 21)	İmipenem	3	5	7	1	-	-	1	3	1	-
	Meropenem	2	-	-	1	4	6	2	1	2	3
<i>cfiA</i> negatif (n= 42)	İmipenem	19	18	2	1	2	-	-	-	-	-
	Meropenem	19	14	6	-	1	1	1	-	-	-

Tablo II. Agar Dilüsyon Yöntemiyle, *cfiA* Gen Varlığına Göre *B.fragilis* Suşlarının İmipenem ve Meropenem $MİK_{50}$ ve $MİK_{90}$ Değerleri ($\mu\text{g/ml}$) ve Direnç Oranları

Direnç geni	İmipenem				Meropenem			
	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	Sayı	%	$MİK_{50}$	$MİK_{90}$	Sayı	%
<i>cfiA</i> pozitif (n= 21)	0.5	16	5	24	4	64	6	28.5
<i>cfiA</i> negatif (n= 42)	0.125	2	0		0.125	4	0	

Tablo III. E-test Yöntemine Göre Meropenem $MİK$ Değerleri $< 0.5 \mu\text{g/ml}$ ve $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ Olan *B.fragilis* Suşlarında *cfiA* Geninin Dağılımı (sayı)

Direnç geni	Meropenem $MİK$ ($\mu\text{g/ml}$)		Toplam
	≥ 0.5	< 0.5	
<i>cfiA</i> pozitif	16	5	21
<i>cfiA</i> negatif	2	40	42
Toplam	18	45	63

suşlarında, moleküler sınıf A ve B'de yer alan iki tip beta-laktamaz tanımlanmıştır. Moleküler sınıf A beta-laktamazlar suşların çoğunda (%79-100) bulunmakta, penisilin ve sefalosporinlere karşı direnç gelişimine yol açmaktadır. Ancak, bu enzimler klasik beta-laktamaz inhibitörleriyle inhibe olmaktadır⁴. Moleküler sınıf B beta-laktamazlar (Bush sınıf-lamasında grup 3a) ise daha nadir görülmekte, özellikle *B.fragilis* türlerinde bulunmakta ve karbapenem direncine yol açmaktadır. Aktif bölgelerinde Zn^{+2} bulduran metallo-beta-laktamaz yapısındaki bu karbapenemazlar, EDTA varlığında inhibe olmakta, klasik beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedir. Bu enzimler, karbapenemlerin yanı sıra diğer beta-laktam antibiyotikleri de hidrolize edebilmektedir^{5,8}. Dirençten sorumlu *cfiA* geni, plazmid veya kromozom üzerinde yer alabilmektedir. Direnç geni *cfiA*, 'sessiz' kalabildiği gibi değişik düzeylerde metallo-beta-laktamaz ifade edebilmektedir. Bu genlere sahip olan bakterilerin yüksek düzeyde metallo-enzim eksprese etmeleri için direnç geninin önünde IS elementinin bulunması gerekmektedir⁹⁻¹².

Hastanemizde imipeneme dirençli ilk suş 1999 yılında, aspirasyon pnömonisi olan hastadan izole edilmiştir. Yapılan ayrıntılı çalışmada bu suşun *cfiA* geni taşıdığı ve bu genin hemen önünde IS1187 bulundurduğu, karbapenemlerin yanı sıra diğer beta-laktam antibiyotiklere de direnç gösterdiği bulunmuştur¹³. Yakın zamanda hastanemizde izole edilen suşların yaklaşık %6-8'i karbapenemlere direnç göstermektedir. Yapılan moleküler çalışmalarla, izolatlarımızın %27 oranında *cfiA* geni, %32 oranında ise IS1187 taşıdığı saptanmış; karbapenemlere dirençli suşlarda her iki gen birlikte bulunmuştur¹⁴. Direnç geni pozitiflik oranımız, Türkiye'de yapılan böyle bir çalışmaya rastlanmadığından ülkemiz verileri ile kıyaslanamamış; diğer ülkelerin sonuçlarına göre ise

yüksek bulunmuştur. Dünyanın farklı ülkelerinde bildirilen çalışmalarda, *Bacteroides* suşlarının %2-7'sinin *cfiA* geni taşıdığı, ancak suşların sadece yaklaşık %1'inin karbapenemlere direnç gösterdikleri saptanmıştır^{5,15,16}. Çalışmamızda saptanan karbapenem direnç oranı da diğer ülkelerin direncine göre yüksek bulunmaktadır. İmipenem ve meropeneme direnç oranları; Amerika Birleşik Devletleri, Kanada ve Avrupa ülkelerinde %0.2-1, Japonya'da %2-4 ve Tayvan'da %7-12 olarak bildirilmektedir¹⁷⁻²⁰. Ülkemizdeki veriler incelendiğinde; sadece Ercis ve arkadaşları²¹ 29 *Bacteroides* üzerinde yaptıkları çalışmada, bir izolatta imipeneme direnç bulmuşlardır. Uygulanan antibiyotik politikasına bağlı olarak ülkeler arasında, aynı ülkenin şehirleri arasında, hatta aynı hastanenin servisleri arasında bile antibiyotiklere direnç oranında farklılıklar görülebilmektedir. Hastanemizde yüksek oranda imipenem ve meropeneme dirençli *B.fragilis* ve *cfiA* gen pozitifliği, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde karbapenemlerin yaygın kullanılıyor olmasına bağlanabilir.

Hastanemizdeki *Bacteroides* suşlarında yüksek oranda *cfiA* geni ve IS elementlerinin bulunması, gelecekte iki genin aynı bakteri içinde yer alma olasılığını artırmaktadır. Hareketli DNA parçaları olan IS elementleri, bir bakteriden diğerine aktarılabilen, *cfiA* direnç geninin önüne yerleştiğinde, genin yüksek düzeyde eksprese olmasına yol açmaktadır^{11,12}. Uygulanacak karbapenem tedavisi bu olasılığı artıracak ve süreci hızlandıracaktır. Bu nedenle ampirik tedaviye başlamadan önce klinik örneklerin alınıp, aerob ve anaerob kültürlerinin yapılması, etken mikroorganizmanın izole edilip karbapenemlere dirençli olup olmadığının belirlenmesi önemlidir. Bunun en pratik ve kısa yolu, FDA'nın agar dilüsyona alternatif olarak önerdiği E-test yönteminin kullanılmasıdır⁷. Bu çalışmada meropenem E-test, agar dilüsyon yönteminde meropenemin, imipenemden farklı olarak geniş bir MİK dağılımı sergilediği ve daha yüksek MİK değerleri gösterdiği için seçilmiştir. Sonuçlarımıza göre E-test ile $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ MİK değerlerine sahip suşlarda *cfiA* geni bulunma olasılığı istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.0001$). Bunun yanı sıra meropenem E-test değerleri ile agar dilüsyon değerleri arasında da uyumluluk görülmüş, dirençli suşlar her iki yöntemle de saptanmıştır.

Sonuç olarak hastanemizde karbapenemlerin yaygın kullanılması, *Bacteroides* suşlarımızda karbapenem direncini kodlayan *cfiA* geninin ve karbapenem direnç oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Laboratuvarında meropenem E-test uygulanması halinde "MİK $\geq 0.5 \mu\text{g/ml}$ " elde edilmesi, *cfiA* geninin bulunma olasılığının yüksek olduğunu gösterecektir. Böylece direnç geni *cfiA*'ya sahip izolatların, karbapenemlere ve diğer beta-laktam antibiyotiklere dirençli olabileceği veya direnç geliştirebileceği öngörülebilir. Sonuçlarımıza göre başarılı bir tedavinin programlanmasında ve sürdürülmesinde, meropenem E-test MİK sonuçlarının yol gösterici olabileceği öne sürülebilir.

KAYNAKLAR

1. Finegold SM. Anaerobic bacteria: general concepts, pp: 2519-75. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds), Principles and Practice of Infectious Diseases. 2005, 5th ed. Churchill Livingstone, Philadelphia.
2. Finegold SM. Perspective on susceptibility testing of anaerobic bacteria. Clin Infect Dis 1997; 25(Suppl 2): S251-3.

3. Hecht DW. Prevalence of antibiotic resistance in anaerobic bacteria: worrisome developments. *Clin Infect Dis* 2004; 39(1): 92-7.
4. Nord CE, Hedberg M. Resistance to beta-lactam antibiotics in anaerobic bacteria. *Rev Infect Dis* 1990; 12(Suppl 2): S231-4.
5. Soki J, Fodor E, Hecht DW, et al. Molecular characterization of imipenem-resistant *cfiA*-positive *Bacteroides fragilis* isolates from the USA, Hungary and Kuwait. *J Med Chem* 2004; 53(Pt 5): 413-9.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria. Approved Standards, M11-A7. 2007, 7th ed. CLSI, Pennsylvania, USA.
7. Citron DM, Ostovari MI, Karlsson A, Goldstein EJ. Evaluation of the E test for susceptibility testing of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol* 1991; 29(10): 2197-203.
8. Walsh TR, Onken A, Haldorsen B, Toleman MA, Sundsfjord A. Characterization of a carbapenemase-producing clinical isolate of *Bacteroides fragilis* in Scandinavia: genetic analysis of a unique insertion sequence. *Scand J Infect Dis* 2005; 37(9): 676-9.
9. Rasmussen BA, Kovacs E. Identification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element. *Plasmid* 1991; 25(2): 141-4.
10. Trinh S, Haggoud A, Reyssat G, Sebald M. Plasmids pIP419 and pIP421 from *Bacteroides*: 5-nitroimidazole resistance genes and their upstream insertion sequence elements. *Microbiology* 1995; 141(4): 927-35.
11. Podglajen I, Breuil J, Collatz E. Insertion of a novel DNA sequences, IS1186, upstream of the silent carbapenemase gene *cfiA*, promotes expression of carbapenem resistance in clinical isolates of *Bacteroides fragilis*. *Mol Microbiol* 1994; 12(1): 105-14.
12. Podglajen I, Breuil J, Rohaut A, Monsempes C, Collatz E. Multiple mobile promoter regions for the rare carbapenem resistance gene of *Bacteroides fragilis*. *J Bacteriol* 2001; 183(11): 3531-5.
13. Toprak Ülger N, Aral C, İlki A, Özel A, Söyletir G. Marmara Üniversitesi Hastanesinde izole edilen ilk imipeneme dirençli *Bacteroides fragilis* kökeninin fenotipik ve genotipik özelliklerinin araştırılması. *FLORA* 2009; 14(4): 175-81.
14. Dengel Uzunkaya O, Ülger Toprak N, Karavus M, Soyletir G. Susceptibility profiles and detection of resistance genes of carbapenems and 5-nitroimidazole among *Bacteroides* spp. in Turkey. 19th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 16-19 May 2009, Helsinki. Abstract Book, p: S618, R2102.
15. Edwards R, Hawkyard CV, Garvey MT, Greenwood D. Prevalence and degree of expression of the carbapenemase gene (*cfiA*) among clinical isolates of *Bacteroides fragilis* in Nottingham, UK. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43(2): 273-6.
16. Soki J, Edwards R, Hedberg M, Fang H, Nagy E, Nord CE. Examination of *cfiA*-mediated carbapenem resistance in *Bacteroides fragilis* strains from a European antibiotic susceptibility survey. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28(6): 497-502.
17. Koeth LM, Good CE, Appelbaum PC, et al. Surveillance of susceptibility patterns in 1297 European and US anaerobic and capnophilic isolates to co-amoxiclav and five other antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53(6): 1039-44.
18. Hedberg M, Nord CE; ESCMID Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria. Antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group isolates in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2003; 9(6): 475-88.
19. Ueno K, Kato N, Kato H. The status of research on anaerobes in Japan. *Clin Infect Dis* 2002; 35(Suppl 1): S54-7.
20. Liu CY, Huang YT, Liao CH, Yen LC, Lin HY, Hsueh PR. Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and *Bacteroides fragilis* isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9): 3161-8.
21. Ercis S, Tunçkanat F, Haşçelik G. Klinik örneklerden izole edilen anaerob gram-negatif basillerin çeşitli antibiyotiklere direnç durumları. XXXI. Türk Mikrobiyoloji Kongresi. 19-23 Eylül 2004, Kuşadası. Kongre Kitabı, P036.