

**T.C.**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**KARBAPENEMAZ ÜRETEN *Klebsiella pneumoniae* SUŞLARININ MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Dr. Serpil GENÇ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**2017**

**T.C.**

**KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ**

**TIP FAKÜLTESİ**

**KARBAPENEMAZ ÜRETEN *Klebsiella pneumoniae* SUŞLARININ MOLEKÜLER  
KARAKTERİZASYONU**

**Dr. Serpil GENÇ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI**

**ETİK KURUL ONAY TARİHİ VE SIRA SAYISI: 14.07.2015-2015/214**

**2017**

## İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR</b> .....	<b>IV</b>
<b>Kısaltmalar dizelgesi</b> .....	<b>V</b>
<b>Çizelgeler dizelgesi</b> .....	<b>IX</b>
<b>Çizimler dizelgesi</b> .....	<b>XI</b>
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	3
2.1.1. Morfoloji, biyokimyasal ve kültürel özellikleri .....	3
2.1.2. Virulans faktörleri .....	3
2.1.3. Epidemiyoloji ve klinik önemi .....	3
2.2. Beta laktam antibiyotikler .....	5
2.2.1. Karbapenemler .....	5
2.2.2. Beta laktam antibiyotiklerin etki mekanizmaları .....	7
2.3. Karbapenem direnci .....	7
2.3.1. Karbapenemazlar.....	8
2.4. <i>Enterobacteriaceae</i> 'da karbapenemaz epidemiyolojisi .....	10
2.5. Karbapenemazların laboratuvar tanısı.....	14
2.5.1. Karbapenemaz varlığını doğrulama yöntemleri .....	16
2.5.2. Genotipik yöntemler.....	19
2.6. Pulse Field Gel Elektroforezi .....	19
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b> .....	<b>22</b>
3.1. Çalışmaya alınan izolatlar .....	22
3.2. Referans suşlar .....	22
3.3. Antibiyotikler .....	22
3.4. Besiyerleri, ayraçlar ve tampon çözeltilerin hazırlanması .....	23
3.4.1. Eozin – Metilen Blue (EMB) agar .....	23
3.4.2. Gliserol (%15) içeren triptik soy buyyon (TSB).....	23
3.4.3. Mueller – Hinton agar (MHA) .....	23
3.4.4. Üç şekerli besiyeri.....	23

3.4.5. Sülfid – indol – hareket besiyeri .....	24
3.4.6. Metil kırmızısı – Voges Proskauer besiyeri .....	24
3.4.7. Simmons sitrat agar .....	24
3.4.8. Üreaz besiyeri.....	24
3.4.9. Tampon çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması.....	24
3.4.10. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması .....	27
3.5. Saklamadan çıkarılan örneklerin çalışılması.....	28
3.5.1. Tanımlamada kullanılan biyokimyasal testler.....	28
3.6. Antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesi.....	29
3.6.1. Disk difüzyon yöntemi .....	30
3.6.2. Agar dilüsyon yöntemi .....	31
3.7. Karbapenemaz genlerinin multipleks PZR ile araştırılması.....	32
3.7.1. Multipleks PZR için kullanılan primerler .....	32
3.7.2. Deoksiribonükleik Asit izolasyonu .....	33
3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	34
3.7.4. Elektroforez ve görüntüleme .....	37
3.8. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin PFGE yöntemi ile araştırılması.....	37
3.8.1. Bakteri kalıplarının hazırlanması .....	38
3.8.2. Bakteri hücrelerinin parçalanması ve DNA izolasyonu .....	38
3.8.3. Agaroz kalıpları içerisindeki DNA nın <i>XbaI</i> restriksiyon enzimi ile kesilmesi .....	38
3.8.4. Elektroforez ve görüntüleme .....	39
3.9. İstatistiksel analiz .....	40
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>41</b>
4.1. İzolatların genel özellikleri.....	41
4.2. Antimikrobiyal duyarlılık.....	43
4.3. Multipleks PZR ile saptanan karbapenemaz üretiminden sorumlu genler ve sıklığı .....	44
4.4. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerin varlığında karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının irdelenmesi .....	50
4.5. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının irdelenmesi .....	51
4.6. PFGE bulguları.....	51
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>60</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>73</b>

<b>7. ÖZET.....</b>	<b>75</b>
<b>8. ABSTRACT.....</b>	<b>77</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>79</b>
<b>10. KAYNAKLAR.....</b>	<b>81</b>



## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bu tezin hazırlanmasında ilgi, destek ve hoşgörüsünü hiç bir zaman esirgemeyen; tez çalışmamın en başından bu yana planlanması ve yürütülmesine katkıları olan değerli danışman hocam Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya,

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden bu yana hiç bir konuda desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesi ile yol gösteren, bilimsel desteğini hep yanımda hissettiğim saygıdeğer hocam Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ'ye,

Eğitimim boyunca bilgi, tecrübe ve bilimsel desteklerini esirgemeyen saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Sema KEÇELİ, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Devrim DÜNDAR, Doç. Dr. Gülden SÖNMEZ TAMER ve Yard. Doç. Dr. Erdener BALIKÇI'ya,

İstatistiksel analizlerin yapılması esnasında desteklerinden dolayı Doç. Dr. Canan BAYDEMİR'e,

PFGE analizi konusunda yardımlarını esirgemeyen İstanbul Medeniyet Üniversitesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Haluk VAHABOĞLU'na,

PZR çalışması için gönderdikleri pozitif kontrollerden dolayı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof. Dr. Özgen ESER'e,

Tezimin her aşamasında sonsuz desteği ve pozitif enerjisini hep yanımda hissettiğim, beraber uzun ve güzel yıllar geçirdiğim Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda görevini layıkıyla yapan asistan arkadaşlarım ve laboratuvar teknisyenlerimize,

Bu günlere gelmemde büyük emekleri olan, ihtiyaç duyduğum her anımda benimle olan başta sevgili annem Türkan, babam İsmet, kardeşlerim Yasemin, Burcu ve Ömer'e, sonsuz özveri ve desteğini her daim gösteren hayat arkadaşım Yılmaz'a ve canım oğlum Ahmet'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Serpil GENÇ

### **Kısaltmalar dizelgesi**

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AK	: Amikasin
AMC	: Amoksisilin/ Klavulanik Asit
AMP	: Ampisilin
ATCC	: American Type Culture Collection
BaCl <sub>2</sub>	: Baryum Klorür
BaSO <sub>4</sub>	: Baryum Sülfat
BAL	: Bronkoalveolar Lavaj
CAESAR	: Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance
CAZ	: Seftazidim
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
ÇİDO	: Çok İlaça Dirençli Organizma
CİP	: Siprofloksasin
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	: Gentamisin
CTX	: Sefotaksim
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DPA	: Dipikolinik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EARSS	: European Antimicrobial Resistance Surveillance System

EDTA	: Etilendiamintetrasetik Asit
EMB Agar	: Eozin Metilen Blue Agar
ETP	: Ertapenem
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GN	: Gram Negatif
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
GP	: Gram Pozitif
HCL	: Hidroklorik Asit
HK	: Hastane Kökenli
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfirik Asit
H <sub>2</sub> S	: Hidrojen Sülfür
IMI	: İmipenem hydrolyzing beta-laktamase
IMP	: İmipenem mediated Metallo Protein
İPM	: İmipenem
IMVIC	: İndol, Metil red, Voges proskauer, Citrat
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KDE	: Karbapenem Dirençli <i>Enterobacteriaceae</i>
KDKP	: Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KOH	: Potasyum Hidroksit
KOL	: Kolistin
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KÜE	: Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacteriaceae</i>



KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
MEM	: Meropenem
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHT	: Modifiye Hodge Testi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
MLST	: Multilocus Sequence Typing
MRSA	: Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
MV	: Mekanik Ventilatör
NaOH	: Sodyum Hidroksit
NCTC	: National Collection of Type Cultures
NDM	: New Delhi Metallo-beta-lactamase
OMP	: Dış Membran Proteini
PBA	: Fenil Boronik Asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PDR	: Mevcut tüm antibiyotiklere dirençli
PFGE	: Pulse Field Gel Elektroforezi
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SENTRY	: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program
SF	: Serum Fizyolojik
ST	: Sekans Tip
SVH	: Serebrovasküler Hastalık

SVK	: Santral Venöz Katater
SXT	: Trimetoprim/ Sülfametaksazol
TA	: Trakeal Aspirat
TBE	: Tris- Borik Asit- Etilendiamintetraasetik Asit
TE	: Tris base- Etilendiamintetraasetik Asit
TG	: Tigesiklin
TK	: Toplum Kökenli
TZP	: Piperasilin/ Tazobaktam
UAMDSS	: Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi
UPGMA	: Unweighted Pair Group Method With Mathematical Averaging
VIM	: Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
mm	: Milimetre
ml	: Mililitre
$\mu\text{mol}$	: Mikromol
$\mu\text{M}$	: Mikromolar
6-APA	: 6-aminopenisilanikasit

## Çizelgeler dizelgesi

1.Çizelge. Karbapenemlerin Sınıflandırılması.....	6
2.Çizelge. <i>Enterobacteriaceae</i> 'da karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazlar.....	9
3.Çizelge. Ana karbapenemazları eksprese eden enterik bakterilerde karbapenemler için MİK değerleri dağılımı.....	15
4. Çizelge. EUCAST önerilerine göre karbapenemaz üreten enterik bakteriler için sınır değerler ve tarama eşik değerleri.....	15
5.Çizelge. Tampon çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması.....	25
6.Çizelge. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması.....	27
7.Çizelge. <i>K.pneumoniae</i> tanımlamasında kullanılan çeşitli biyokimyasal testler ve pozitiflik yüzdeleri.....	29
8.Çizelge. Disk difüzyon yöntemi ile çalışılan antibiyotikler ve zon çapı (mm) sınır değerleri.....	30
9.Çizelge. “EUCAST” <i>Entrobacteriaceae</i> antibiyotik MİK sınır değerleri.....	32
10.Çizelge. Multipleks PZR Panel I’de kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.....	33
11.Çizelge. Multipleks PZR Panel II’de kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.....	33
12.Çizelge. Multipleks PZR Panel I’de (IMP-VIM) karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları.....	35
13.Çizelge. Multipleks PZR Panel II’de (KPC, NDM, OXA-48) karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları.....	36
14.Çizelge. Multipleks PZR Panel I ve II için döngü şartları.....	37
15.Çizelge. Çalışmaya alınan <i>K. pneumoniae</i> suşlarının izole edildiği örnek türü ve kliniklere göre dağılımı.....	42

16.Çizelge. Suşların antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	44
17.Çizelge. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerin görülme sıklığı.....	46
18.Çizelge. Karbapenem üretiminden sorumlu genlerin YBÜ ve YBÜ dışı bölümler arasındaki dağılımı.....	47
19.Çizelge. Genler ve karbapenem duyarlılıklarının karşılaştırılması.....	50
20.Çizelge. PFGE yapılan 84 suşun PFGE paternleri, suşların izole edildikleri örnek türü, klinikler ve izolasyon tarihleri.....	54
21.Çizelge. PFGE ile farklı paternlerde saptanan suşların antibiyotik duyarlılıkları.....	59



## **Çizimler dizelgesi**

1.Çizim. İnhibitör testlerin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması.....	17
2.Çizim. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlere ait pozitif ve negatif kontrol örneklerinin jel görüntüleri.....	47
3.Çizim. İzolatlarda saptanan karbapenemaz üretiminden sorumlu genlere ait jel görüntüleri.....	48
4.Çizim. İzolatların PFGE analizi ile elde edilen dendrogramı.....	52
5.Çizim. PFGE bant profilleri.....	53



## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Son yıllarda sıklığı giderek artan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de sorun oluşturmaktadır. *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnci en sık karbapenemleri hidrolize eden beta laktamazlara (karbapenemazlar) bağlıdır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) ülkemiz hastanelerinde > %50 prevalans değerlerine ulaşması karbapenem kullanımını arttırmış ve karbapenem direnci gelişimine zemin hazırlamıştır. Ülkemizdeki en yaygın karbapenemaz Oxacillinases-48 (OXA-48) olmakla birlikte farklı karbapenemazlar da bildirilmektedir. Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase-5 (VIM-5), İmipenem mediated Metallo Protein-1 (IMP-1), New Delhi Metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1) ve *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2 (KPC-2) bunlar arasında sayılabilir.<sup>1</sup>

Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) oranı Centers for Disease Control and Prevention (CDC) National Healthcare Safety Network 2008 verilerine göre Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde %3,6-10,8 olarak bildirilirken, European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) verilerinde Avrupa'da %0,6 olarak bildirilmiştir.<sup>2</sup> Ülkemizde 2007 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada *K.pneumoniae* suşlarında imipenem direnci %3,2 olarak bildirilmiştir.<sup>3</sup> Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2013 raporuna göre ülkemiz genelinde invazif *K. pneumoniae* suşlarında karbapenem direnci %10'u aşmıştır (imipenem %16, meropenem %15,40).<sup>4</sup> Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance (CAESAR) verilerine göre ise bu oran 2014'te %28, 2015'te %30 olarak bildirilmiştir.<sup>5</sup>

Dünyada ve ülkemizde bu konu ile ilgili pek çok merkezde çeşitli araştırmalar yapılmakta, özellikle organizmaların sahip olduğu karbapenemaz genleri ve izolatların birbirleri ile olan klonal ilişkileri incelenmektedir.<sup>6,7</sup>

Çoğu ülkede karbapenemaz üretimini saptamada bir protokol geliştirilmediğinden, karbapenemaz üretiminin gerçek prevalansı ve hangi hızda yayıldığı halen bilinmiyor. Gelecekte karbapenemaz üreten hastane kökenli (HK) *K.pneumoniae* suşları ile olası bir epideminin gerçekleşmesi öngörülmektedir. Bu nedenle bu dirençli

mikroorganizmaların erken tanımlanması salgınların önlenmesinde önemli bir yere sahiptir.<sup>8</sup>

Ülkemizde karbapenem direncinden çoğunlukla *bla*<sub>OXA-48</sub> geni sorumlu olmakla beraber son yıllarda yaklaşık üç milyon ortadoğu kökenli mültecinin Türkiye'ye girmesi ile birlikte, ülkemizde nadiren izole edilen farklı karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* suşlarının ve epidemiyolojik klonların görülebileceği dikkate alınmalı ve bu konu ile ilgili yeni çalışmalar yapılmalıdır.

Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde tedavi olan hastalardan izole edilen *K.pneumoniae* suşlarında sıklıkla karbapenem direncinden sorumlu olan karbapenemaz enzimlerini kodlayan genlerin ve suşların klonal ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Klebsiella pneumoniae*

#### 2.1.1. Morfoloji, biyokimyasal ve kültürel özellikleri

*K.pneumonia*, gram negatif, hareketsiz, sporsuz, 0,6-6 µm uzunluğunda ve 0,3-1 µm genişliğinde basil veya kokobasildir. Friedlander basili olarak da bilinen bakteri *Enterobacteriaceae* ailesi içinde yer alır.<sup>9</sup> Laktoz/ sukroz/ glikozu fermente eder ve gaz oluşturur. Enterik bakterilerin tür tayininde kullanılan, İndol, Metil red, Voges proskauer, Citrat (IMVIC) kimyasal reaksiyon sırası (- - + +) dır. Polisakkarit yapısında kapsüllü, aerop/ fakültatif anaerop, oksidaz negatiftir. Üreyi hidroliz eder. Hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) negatiftir. Pek çok klinik örnekten izole edilebilen basil, kanlı, çukolatamsı, Eozin Metilen Blue (EMB), MacConkey agarda ek bir büyüme faktörüne ihtiyaç duymadan S ve M tipi büyük koloniler oluşturarak kolaylıkla ürer.<sup>10</sup> Ampisiline doğal dirençlidir.<sup>11</sup>

#### 2.1.2. Virulans faktörleri

*K.pneumoniae* 'nın, enfeksiyon patogeneğinde rol oynadığı bilinen, kapsüler serotip, hipermukovizkozite fenotipi, lipopolisakkarit, siderofor ve adezinler olmak üzere çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. K1-2 kapsüler serotip fagositozun önlenmesinden, lipopolisakkarit endotoksin oluşumundan ve hipermukovizkozite fenotipi de serum bakterisidal etkisine karşı dirençten sorumludur. Enterobaktin ve aerobaktin gibi sideroforlar demir alımını sağlayıp üremeyi kolaylaştırarak, adezinler ise bakterinin dokulara bağlanmasını sağlayarak patogeneğinde ana rol oynar.<sup>12, 13, 14</sup>

#### 2.1.3. Epidemiyoloji ve klinik önemi

*K.pneumonia* genellikle immün direnci düşük (diyabet, alkolizm, malignite, steroid tedavisi alanlar, renal fonksiyon bozukluğu olanlar vb.) kişilerde ya da HK enfeksiyona neden olan fırsatçı bir patojendir. Doğada da yaygın olarak bulunabilen bakteri, sağlıklı kişilerde orofarinkste %1-6 ve dışkıda %5-38 oranında normal florada bulunabilir. Bu oran hastanede yatanlarda orofarinks ve dışkıda sırasıyla %20 ve %77'lere çıkabilir.<sup>9, 15</sup> Artan kolonizasyon oranı antibiyotik kullanımı ile ilişkilendirilmiştir. *Klebsiella spp.* ile gelişen HK enfeksiyonlarda, dışkıda taşıyıcı olanlardaki enfeksiyon riskinin, taşımayanlara göre 4 kat artmış olduğu saptanmıştır.<sup>15</sup>



Son yıllarda sağlıklı kişilerde beklenmedik vücut bölgelerinde (göz, akciğer, beyin, kemik vb.) metastaz ile birlikte görülen toplum kökenli (TK) piyojenik karaciğer apsesinden sorumlu, hipervirülan varyant olarak tanımlanan yeni *K.pneumoniae* suşları izole edilmektedir.<sup>10</sup> Tüm nozokomiyal enfeksiyonların %3-8'i, yoğun bakım hastalarındaki nozokomiyal enfeksiyonların ise %4- 17'si *K.pneumoniae* ile gelişmekte ve sıklığı giderek artmaktadır.<sup>15</sup> *K.pneumoniae* esasen HK enfeksiyon etkeni olarak en sık üriner sistem enfeksiyonu (%6-17), pnömoni (%7-14), primer kan dolaşımı enfeksiyonu (%4-15) ve yara yeri enfeksiyonu (%2-4) ile karşımıza çıkmaktadır.<sup>12</sup> Bu enfeksiyonların gelişmesindeki majör risk faktörleri ise üriner kateter, endotrakeal tüp ve intravenöz kateter gibi invaziv araç kullanımı ve daha önceki antibiyotik kullanımı olarak bildirilmektedir.<sup>15</sup> TK enfeksiyonlar ise daha az sıklıkta, yine üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni ve özellikle Asya'da bildirilen karaciğer absesi şeklinde görülmektedir.

HK enfeksiyon etkeni olarak izole edilen suşlar genellikle çoğul dirençli olmaktadır. Geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımının çok yaygın olması *K.pneumoniae* 'nın da aralarında olduğu HK enfeksiyon etkenlerinin çoklu ilaç direnci geliştirmesine neden olmuştur. GSBL pozitif *K.pneumoniae* 'larda karbapenem grubu antibiyotiklerin yoğun kullanımı, karbapenem direncini de beraberinde getirmiştir.<sup>15</sup> Bu direncin plazmitler aracılığıyla aktarılabilir olması ülkemiz ve hastanemizde de olduğu gibi tüm dünyada karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE)'yi önemli bir sorun haline getirmiştir. Direncin ve yayılımının önlenmesi için hazırlanan çeşitli rehberlerde antibiyotik kullanımının kısıtlanması ve izolasyon önlemleri gibi koruyucu önlemler önerilmektedir.<sup>16</sup>

On yıl önce nadiren bildirildikleri halde, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* günümüzde artan sıklıkla bildirilmektedir. Karbapenemaz özelliklerine sahip farklı enzim grupları ortaya çıkmış ve dünya çapında yayılmıştır. KPC enzimleri daha çok HK enfeksiyonlardan izole edilirken, NDM ve OXA-48 TK enfeksiyonlardan da izole edilmektedir.<sup>17</sup>

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), KÜE'yi insan sağlığına yönelik en büyük üç tehditte biri olarak sınıflandırmaktadır. KPC ve NDM'nin küresel etkisi, antibiyotik çağının sonu olduğuna dair dünya çapında bir korku yaratmıştır. KPC, OXA-48, VIM, IMP ve NDM başta olmak üzere karbapenemazların moleküler epidemiyolojisi üzerine yapılan

araştırmalar, bu karbapenemazların yaygınlığının hızlı ve kalıcı olduğunu ortaya koymaktadır.<sup>18</sup>

Bu mikroorganizmalarla enfekte olan hastalarda mortalite hızı %50 ve üzerindedir.<sup>19</sup> Bu suşlar karbapenem grubu dışındaki, aminoglikozit ve kinolon gibi pek çok antibiyotiğe de dirençlidir. Nitekim mevcut tüm antibiyotiklere dirençli (PDR) organizmalar da bildirilmiştir.<sup>20, 21</sup> Örneğin bir yıllık süreçte izole edilen 3846 *K.pneumoniae* suşunun 946'sı KDKP olarak saptanan çalışmada, uzun süreli bakım hastanelerinde KDKP enfeksiyon hızı %25, suşların kolistin direnci %16, amikasin direnci %59,2, kinolon direnci ise %97'nin üzerinde bulunmuştur.<sup>22</sup> Bu durum KDKP ile gelişen enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilir antimitrobiyal seçeneklerini kısıtlamaktadır. Ayrıca direnç genlerini barındıran plazmitler, pek çok enterik bakteri arasında transfer olabilmesi nedeniyle de dünya genelinde halk sağlığını tehdit etmektedir. Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* (KDE) enfeksiyonları halen sıklıkla HK enfeksiyon olarak karşımıza çıkmaktaysa da giderek artan sıklıkta TK enfeksiyonlarda da görülmektedir.<sup>23</sup>

## **2.2. Beta laktam antibiyotikler**

Beta laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösteren geniş spektrumlu antibakteriyal ajanlardır. Beta laktam antibiyotiklerde, biri azot üçü karbon dört üyeli doymuş bir halkadan oluşan beta laktam halkası ortak olup antibakteriyel etkiden sorumludur. Monobaktamlar hariç, bu ana halkaya ikinci bir halkanın eklenmesiyle 6-aminopenisilanikasin (6-APA) oluşur. 6-APA molekülüne çeşitli yan zincirler eklenmesi ile farklı moleküler yapı ve etkinliğe sahip 5 temel grup beta laktam antibiyotik elde edilmiştir.<sup>24, 25</sup>

1. Penisilinler
2. Sefalosporinler
3. Monobaktam
4. Karbapenemler
5. Beta laktamaz inhibitörleri

### **2.2.1. Karbapenemler**

Karbapenemler, beta laktam antibiyotikler içindeki diğer gruplarla karşılaştırıldığında en geniş spektrumlu antibakteriyel etkiye sahip gruptur.<sup>26</sup> GP ve GN

hücre duvarlarında bulunan PBP'lere olan yüksek afinitesi ve küçük moleküller olmaları nedeniyle hızlı bakterisidal etkiye sahiptirler.<sup>27</sup> *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.*, *Burkholderia cepacia* gibi non fermentatif GN mikroorganizmalara, *Escherichia coli* (*E.coli*) gibi GSBL, *Enterobacter* türleri gibi AmpC üreten bakterilere, streptokok, metisilin duyarlı stafilokok, *Neisseria* ve *Haemophilus*'a karşı oldukça etkindir. Diğer geniş spektrumlu antibiyotiklerin aksine *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* ve *Clostridium perfringens* gibi GN ve GP anaeroplara karşı da etkilidir. Geniş antibakteriyel etkisi, beta laktamazlara dayanıklı olması ve güvenli kullanım aralığı nedeniyle ciddi enfeksiyonların tedavisindeki önemli seçeneklerden biridir. Hatta Meropenem, klavulanik asit ile kombine kullanıldığında, normalde kromozomal beta-laktamazına bağlı olarak beta-laktamlara dirençli olan çoklu ilaç dirençli *Mycobacterium tuberculosis*'i öldürebilir.<sup>28</sup> Ancak, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Enterococcus faecium*, *Stenotrophomonas maltophilia* ve metallo beta laktamaz üreten GN mikroorganizmalara etkinliği yoktur.<sup>27, 29</sup> İmipenem, panipenem ve doripenemin gram pozitiflere, meropenem, ertapenem ve biapenemin ise gram negatiflere daha etkin olduğu belirtilmiştir.<sup>26</sup>

Karbapenemlerin etki spektrumlarına göre önerilen sınıflandırılması 1.Çizelge'deki gibidir.

1.Çizelge. Karbapenemlerin Sınıflandırılması.

Grup 1	Grup 2	Grup 3
Ertapenem	Meropenem	Razupenem
Panipenem	İmipenem	Tebipenem
	Doripenem	Tomopenem
	Biapenem	Sanfetrinem

Birinci grup karbapenemler gram negatif non fermentatif bakterilere sınırlı etkinlik gösterir, özellikle toplumdan kazanılmış ciddi enfeksiyonların tedavisinde uygundur. İkinci grup karbapenemler ise güçlü nonfermentatif etkinlikleri nedeniyle HK enfeksiyonların

tedavisinde kullanılır. Üçüncü grup karbapenemler çalışmaları devam etmekle birlikte ikinci grubun etkinliğine ek olarak “MRSA”ya karşı da aktivite göstermektedir.<sup>26</sup>

### 2.2.2. Beta laktam antibiyotiklerin etki mekanizmaları

Beta laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarında bulunan kısa peptid zincirleri ile birbirine çapraz bağlarla bağlanmış peptidoglikan tabakasının sentezini engelleyerek antibakteriyel etki gösterirler. Bu tabaka mikroorganizmanın yapı ve bütünlüğünü sağlar. Beta-laktam antibiyotiklerin bakteri hücrelerindeki hedefi, hücre duvar sentezinin transpeptidasyon basamağından sorumlu olan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP)'dir. Beta-laktam antibiyotikler, PBP'lerin substratı olan D-alanin molekülleriyle benzerliklerinden dolayı bu enzimlere geri dönüşümsüz bağlanıp, enzimin substratına bağlanmasını engeller.<sup>30</sup> Hücre duvar yapısı bozulan bakteri ozmotik direnç kaybına uğrayarak lizis olur.<sup>24</sup>

Beta-laktam antibiyotiklerin etkinlik göstermeleri için hedeflerine bağlanmaları gerekir. Bunun için GN bakterilerde porin (Dış Membran Proteini, OMP) adı verilen protein kanalcıklarından geçmeleri, periplazmik boşlukta yer alan beta laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir. GP bakterilerde ise daha kalın bir peptidoglikan tabaka olmasına karşın dış membran bulunmaz. Beta laktamazları da bu tabakada ya da serbest olarak bulunur.<sup>24</sup>

### 2.3. Karbapenem direnci

Non-fermentatif GN bakterilerin çoğunda ( *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*,) *Enterobacteriaceae* ailesinde (özellikle *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.*) ve GP koklarda ( *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus spp.*) ve *Nocardia spp.* 'de kliniklerde kullanılabilen çoğu karbapenemlere karşı direnç gözlenmektedir. Bu durum toplum sağlığı açısından tüm dünyada önemli bir sorun teşkil etmektedir.<sup>31</sup>

Karbapenemlere direnç mekanizmaları; karbapenemaz enzimlerinin üretimi, atım (efluks) pompaları, porin ve PBP'lerin ekspresyonlarını ve/veya fonksiyonlarını değiştiren mutasyonlar gibi çeşitli mekanizmalarla meydana gelebilir. Bu mekanizmaların birkaçının birlikte görülmesi, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi türlerde yüksek düzey karbapenem direncine ve farklı direnç fenotiplerine yol açmaktadır.<sup>8, 18</sup>

GP koklarda karbapenem direnci, PBP'lerin aminoasit dizilerindeki değişimlere ya da karbapenemlere dirençli yeni bir PBP kazanmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktayken, GN lerde  $\beta$ -laktamazların üretimi ön planda olmakla birlikte porin kayıpları, PBP değişimleri ve atım pompalarının ekspresyonu da karbapenem direncinde rol almaktadır.<sup>31</sup> Bazı suşlarda, atım pompalarıyla oluşan dirence ya da membran geçirgenliğinde azalmaya, GSBL ya da AmpC enzimlerinin aşırı üretiminin eşlik etmesiyle de karbapenem direnci oluşabilir. Plazmitte kodlanan karbapenemaz enzimi dışındaki mekanizmalarla meydana gelen karbapenem direnci aktarılamamaktadır.<sup>32, 33</sup>

### 2.3.1. Karbapenemazlar

Enterik bakterilerdeki karbapenem grubu antibiyotiklere karşı en sık karşılaşılan direnç mekanizmasıdır. Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen derecelerde olmak üzere karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz edebilen beta-laktamazlardır. Etki ettikleri beta-laktam ajanlar açısından farklılık gösterirler.<sup>33</sup>

Karbapenemazlar kromozomal ve kazanılmış olmak üzere iki sınıfa ayrılırlar. Kromozomal olan gruba, *Bacillus cereus* II, *B. fragilis*'in CcrA, *Burkholderia cepacia*'nın PCM-1, *Stenotrophomonas maltophilia*'nın L1, *Chryseobacterium indologenes*'in IND-1-4, *C. meningosepticum*'un bla<sub>B</sub> enzimleri örnek verilebilir. Tümü fonksiyonel sınıflamada grup 3'te, moleküler sınıflamada ise sınıf B'de yer alan metallo enzimlerdir.<sup>34</sup> Sınıf A'da yer alan NMC/IMI (not metallo enzyme carbapenemase/ Imipenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamase) ve SME (*Serratia marcescens* enzyme) de kromozomal olarak kodlanan karbapenemazlardandır.<sup>35</sup>

Kazanılmış karbapenemaz genleri ise, genellikle diğer direnç genlerini de taşıyan plazmitlerde lokalize olup, yüksek oranda aktarılabılır olduklarından, uygun antibiyotik tedavisi ve kontrol önlemlerinin alınması için hızlıca saptanmaları dünya genelinde epidemiyolojik açıdan önem taşır.<sup>36</sup>

Kazanılmış karbapenemazlar, preteinlerin aminoasid dizisini temel alan Ambler moleküler sınıflamasında A, B, C, D sınıfında yer alır. Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından, substrat profilleri, beta laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özellikler esas alınarak yapılan fonksiyonel sınıflamada ise 2d, 2f ve 3 içerisinde yer alır.<sup>37</sup>

Sınıf A, C ve D’de yer alan enzimlerin aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunurken, Sınıf B’deki metallo beta-laktamaz olarak adlandırılan enzimlerin aktif bölgesinde çinko bulunmaktadır. Nozokomiyal patojenler arasında klinik öneme sahip olanlar sınıf A, B, D dir ve plazmit ile aktarılırlar.<sup>38</sup> Kromozomal olarak kodlanan Sınıf C (AmpC) karbapenemlere karşı zayıf aktivite gösterir ancak klinik olarak önemli sayılmazlar.<sup>39</sup>

*Enterobacteriaceae*’da karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazlar 2.Çizelge’de sınıflandırılmıştır.

2.Çizelge. *Enterobacteriaceae*’da karşılaşılan plazmit kökenli karbapenemazlar.<sup>37</sup>

Enzim	Moleküler sınıf	Fonksiyonel grup	Aztreonam hidrolizi	EDTA ile inhibisyon	KA ile inhibisyon
KPC	A	2f	+	-	±
VIM	B	3	-	+	-
IMP	B	3	-	+	-
NDM	B	3	-	+	-
OXA-48	D	2d	-	-	±

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit, KA: Klavulanik Asit

### 2.3.1.1. A sınıfı karbapenemazlar

Bu grupta klinik olarak önemli enzim KPC tipi enzimlerdir. Aztreonam dahil tüm beta laktamları hidroliz edebilirler. Boronik asitle ve kısmen de klavulonik asitle inhibe olurlar.<sup>39</sup> Günümüzde KPC-24’e kadar farklı varyantları bildirilen KPC (KPC-2) ilk olarak 1996’da ABD’nde bir *K.pneumoniae* suşunda tespit edilmiş ancak ülkeler ve kıtalar arası yayılım göstermiştir.<sup>35, 40</sup>

### 2.3.1.2. B sınıfı karbapenemazlar

Metallo beta-baktamazlar (MBL) olarak ta adlandırılırlar. Karbapenem hidroliz aktiviteleri diğer karbapenemazlardan daha fazla ve karbapenemler için oluşturdukları MİK değerleri daha yüksektir.<sup>37</sup> Enterik bakterilerde sık karşılaşılan MBL’lar IMP, VIM ve NDM enzimleridir. Aztreonam hariç penisilin, sefalosporinler ve karbapenemler gibi geniş bir antibiyotik grubunu hidroliz edebilirler. Mevcut beta laktamaz inhibitörleri

(klavulonik asit, tazobaktam, sulbaktam) ile inhibe olmazlar. EDTA ve Dipikolinik Asit (DPA) ile inhibe olurlar.<sup>39</sup>

### 2.3.1.3. D sınıfı karbapenemazlar

Oksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz etmelerinden dolayı oksasilinazlar olarak ta adlandırılırlar. Karbapenemleri zayıf hidroliz ederler.<sup>37</sup> Genellikle seftazidim, sefotaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmez ya da zayıf bir şekilde hidroliz ederler. Klavulonik asitle zayıf inhibe olurlar. Sıklıkla *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* türlerinde daha az olarak enterik gram negatif bakterilerde bulunurlar. Ancak, ülkemizde OXA-48 aracılığıyla *Enterobacteriaceae*'da artan oranlarda karbapenem direnci bildirilmektedir. OXA 23-27-49-24-25-26-40-72-51-58 *Acinetobacter* türlerinde karbapenemaz aktivitesi gösterir. Enterik bakterilerdeki karbapenemaz aktivitesi olan enzimler sıklıkla OXA-48 ve OXA-181 dir.<sup>37</sup>,  
39

### 2.4. *Enterobacteriaceae*'da karbapenemaz epidemiyolojisi

KPC üreten *Enterobacteriaceae*'nın dünya çapındaki yayılımı gram negatifler arasındaki en önemli çok ilaca dirençli organizma (ÇİDO) pandemisi olarak nitelendirilebilir. Özellikle *K.pneumoniae*'da saptanan genin çoğunluğu sekans tip 14 (ST14) veya ST258 klonuna ait olmakla birlikte çok sayıda *K. pneumoniae* sekans tipinde de tespit edilmiştir. ÇİD *K. pneumoniae* suşları dünya genelinde salgınlardan bildirilmekle birlikte, çok sayıda ülkede endemik hale gelmiştir.<sup>41</sup>

KPC ilk kez 1996 yılında bir *K. pneumoniae* suşunda Kuzey Carolina'da saptanmış olup ABD'nde en sık saptanan karbapenemazdır.<sup>42</sup> Günümüzde KPC tipi karbapenemazların yirmidört alt tipi bildirilmiştir.<sup>40</sup> KPC-2 ve KPC-3 en sık rastlanan tiplerdir. İlk bildirimden ardından ülkede pek çok hastaneden KPC üreten enterik bakteri üretimi raporlanmıştır. 2006 yılında yapılan çok merkezli bir çalışmada *K.pneumoniae* suşlarında  $bla_{KPC}$ 'nin yaygınlığı %36 olarak saptanmış, bu oran ilginç bi şekilde 2009'da %25'e, 2013'te ise %13'e gerilemiştir.<sup>43</sup> Ohio, Pennsylvania ve Michigan'da yapılan diğer bir çalışmada KPC enzimi üreten enterik bakterilerin bölgede endemik olduğu özellikle de *K.pneumoniae* ST258 klonunun bundan sorumlu olduğu görülmüştür. Çalışmadaki suşlarda saptanan karbapenemaz genlerinin %90'dan fazlasını KPC-2 ve 3 enziminin oluşturduğu ayrıca belirtilmiştir.<sup>44</sup>

Avrupada ise KPC üreten enterik bakteriler sıklıkla akdeniz ülkelerinde rapor edilmiştir. 2014-15'te İtalya ve Yunanistan bu enzim için endemik bölge olarak rapor edilmiştir. Diğer karbapenemaz genleri mevcutsa da, KPC bu iki ülkede hala karbapenemaz direncinin en sık nedenidir.<sup>45</sup> 2012-14 yılları arasında İtalya'da 436 karbapenemaz üreten *Klebsiella* ile yapılan bir çalışmada 432'sinde de KPC tespit edilmiştir.<sup>46</sup>

Yunanistan'da 10 yıllık bir çalışma ile elde edilen verilere göre yıllar içinde dramatik olarak KPC üretimi artmıştır. 2008 yılından önce hiç enzim tespit edilememişken bu yıldan itibaren prevalans oldukça artmış ve 2014'te *K.pneumoniae* suşlarının büyük kısmının *bla<sub>KPC</sub>* taşıdığı tespit edilmiştir.<sup>47</sup>

KPC enzimi Asya'da özellikle Çin'de rapor edilmiştir.<sup>48</sup> 2011 yılındaki bir çalışmada 109 ertapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin %71'inde *bla<sub>KPC-2</sub>* saptandığı raporlanmıştır.<sup>49</sup>

Ülkemizde ise ilk olarak Labarca ve ark.<sup>50</sup> 2012 yılında Romanya'daki bir hastaneden İstanbul'a sevk edilen 80 yaşındaki bir kadın hastanın trakeal aspirat kültüründen imipenem, meropenem, ertapenem ve kolistin dirençli KPC-2 pozitif *K.pneumoniae* suşunu izole etmişlerdir. Sekans analizi yapılmış olan suşun, dünya çapında KPC üreten *K. pneumoniae*'da sıklıkla rastlanan ST258'e sahip olduğu belirlenmiştir.

Ülkemizde sonrasında yapılan çoğu çalışmada *bla<sub>KPC</sub>* taşıyan *K.pneumoniae* izolatu saptanamamıştır.<sup>51, 52, 53</sup> Nadir olarak izole edildiği bildirimler de mevcuttur.<sup>54, 55, 56</sup> İstanbul'da bir üniversite hastanesinden 2013 yılında izole edilen 22 KDE ile yaptıkları çalışmada Poirel ve ark.<sup>54</sup> iki *K.pneumoniae* izolatında *bla<sub>KPC-2</sub>* saptadıklarını bildirmişlerdir. Özbek ve ark.<sup>55</sup> ise 2015 yılında 40 KDE'de bir *E.coli* izolatında *bla<sub>KPC</sub>* saptamışlardır. Kuşkucu ve ark.<sup>56</sup> 2016 yılında 4052 adet *E.coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada karbapenem dirençli 24 suşun sadece ikisinde KPC-2 enzimi saptadıklarını bildirmiştir. "EuSCAPE" verilerine göre ise 2014-2015 yılları arasında ülkemizde *bla<sub>KPC</sub>* bildirimini hiç yapılmamıştır.<sup>45, 57</sup>

*Enterobacteriaceae* ailesinde ilk *bla<sub>IMP-1</sub>* geni Japonya'da *S. marcescens* 'den izole edilmiş ve 7 hastanedeki salgınla ilişkilendirilmiştir.<sup>8</sup> Sonrasında IMP üreten enterik bakteri ülke genelinde bildirilmeye devam etmiştir.<sup>41</sup> Günümüzde dünya genelinde çeşitli bakteri türlerinde IMP'nin 53 adet tipi tanımlanmıştır.<sup>40</sup> IMP üreten enterik bakteriler



Taiwan ve Japonya’da endemik olarak görülmekteyken, diğer ülkelerdeki *bla*<sub>IMP</sub> bildirimleri çoğunlukla sporadik salgınlar veya tek olgular şeklinde olmaktadır.<sup>8</sup>

Ülkemizde ilk IMP-1 pozitifliğini Aktaş ve ark.<sup>58</sup> nöroblastomalı bir çocuğun kan kültüründen izole edilen *K.pneumoniae* suşunda bildirmişlerdir. Bundan sonra yapılan çoğu çalışmada *bla*<sub>IMP</sub> pozitifliği bildirilmemiştir.<sup>51, 53, 54</sup> Nadir olsa da *bla*<sub>IMP</sub> bildiren yayınlar da mevcuttur.<sup>52, 59, 60, 61</sup> Zarakolu ve ark.<sup>61</sup> 2009-2013 yılları arasında kolonizasyon açısından taradıkları 4105 hastadan izole ettikleri 279 KDKP suşunun sadece birinde *bla*<sub>IMP</sub> pozitifliği saptamışlardır. Çakar ve ark.<sup>52</sup> 2016 yılında “EuSCAPE” projesi kapsamında çeşitli merkezlerden toplanan 124’ünü *K.pneumoniae*’nin oluşturduğu 155 KDE ile yaptıkları çalışmada iki *K.pneumoniae* izolatında *bla*<sub>IMP</sub> saptadıklarını bildirmişlerdir.

VIM tipi MBLlar ilk olarak 1996 ve 1997’de *P. aeruginosa*’da Verona, İtalya’dan (VIM-1) ve Marseilles, Fransa (VIM-2) dan izole edilmiştir.<sup>62, 63</sup> 2000’li yılların başlarında VIM tipi MBL üreten enterik bakteriler pek çok ülkeden rapor edilmeye devam etmiştir. *K.pneumoniae* ve *E.coli*’de VIM tipi enzimlerin en sık görüldüğü ülke Yunanistan’dır.<sup>41</sup> Günümüzde 46 adet VIM enzimi tanımlanmıştır.<sup>40</sup> Dünya genelinde en yaygın tipi *P.aeruginosa*’da VIM-2, enterik bakterilerde ise VIM-1 dir.<sup>64</sup>

VIM-5 2003 yılında ilk defa ülkemizden bildirilmiştir.<sup>65</sup> İlk VIM-1 bildirimini Yıldırım ve ark.<sup>66</sup> tarafından 2007’de yapılmış olup o zamana kadar ülkemizde sadece VIM-5 enzimi saptanmıştır. Bundan sonra da *Enterobacteriaceae*’da sık olmamakla birlikte *bla*<sub>VIM</sub> bildirimleri yapılmıştır.<sup>51, 52, 53, 55, 60</sup> Demir ve ark.<sup>51</sup> 2015 yılındaki bildirimlerinde 80 KDE izolatından ikisinde (*Enterobacter cloacae*) VIM pozitifliği saptadıklarını belirtmişlerdir. Baran ve ark.<sup>53</sup> ise 2016 yılında 181 KDE izolatından sadece bir *K.pneumoniae* suşunda *bla*<sub>VIM</sub> saptadıklarını bildirmişlerdir. Yine 2016 yılında yapılan bir çalışmada “EuSCAPE” projesi kapsamında çeşitli merkezlerden toplanan 124 KDKP izolatından dördünün sadece VIM, üçünün OXA-48 ile birlikte VIM, birinin ise NDM ile birlikte VIM enzimini ürettiğini saptamışlardır.<sup>52</sup>

MBL üreten enterik bakterilere olan dikkat 2008’de ST14 *K.pneumoniae* suşunda NDM adı verilen yeni bir MBL enziminin saptanmasıyla artmıştır. Hindistan New Delhi’de sağlık hizmeti almış olan bir İsveçli hastadan üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak izole

edilmiştir.<sup>67</sup> Ancak SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (SENTRY) verileri *bla<sub>NDM</sub>* geninin 2006 başlarından beri Hindistan’da dolaştığını düşündürmüştür.<sup>68</sup> Tanımlandığı günden beri, hızlı gen transferi sayesinde dünya genelinde türler arası yayılımı artmıştır. Hindistan’ın alt bölgeleri gibi endemik olan bölgelerde NDM tip MBL lar diğer karbapenemazlara göre çok daha fazla belirlenmektedir. Yapılan bir çalışmada Hindistan’dan toplanan 235 suşun %28’inin en az bir karbapenemaz geni taşıdığı ve bunun da %50’sinin *bla<sub>NDM</sub>* olduğu saptanmıştır.<sup>69</sup> Diğer ülkelerde sıklıkla sporadik olgular şeklinde bildirimler yapılmaktadır.<sup>41</sup> Günümüzde 16 adet alt tipi tanımlanmıştır.<sup>40</sup>

NDM enzimi, ülkemizde ilk defa 2011 yılında İstanbul’da, Irak’tan gelen 16 yaşındaki bir lösemi hastasının kan kültüründen izole edilen *K.pneumoniae* suşunda saptanmıştır.<sup>70</sup> Bundan sonra da ülkemizde NDM-1 üreten *K.pneumoniae* bildirimleri yapılmıştır.<sup>52, 71</sup> 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada Demir ve ark.<sup>51</sup> *Enterobacteriaceae* suşlarında NDM-1 prevalansını %10,5 olarak raporlamışlardır. Iraz ve ark.<sup>72</sup> yine 2015 yılında yaptıkları çalışmada NDM-1 oranını *K.pneumoniae* suşlarında %19 olarak belirtmişlerdir.

NDM tipi MBL'lere özgü bir diğer husus da düşük gelirli ülkelerde çevresel kaynaklar yoluyla topluma yayılabilmesidir. 2011 yılında Hindistan’da yapılan bir nokta prevalans çalışmasında musluk suyu örneklerinin %4’ünün ve su birikinti örneklerinin %30’unun NDM pozitif bakteri içerdiği saptanmıştır.<sup>73</sup>

OXA-48 enzimi, ilk defa 2001 yılında ülkemizde bir *K.pneumoniae* izolatında saptanmıştır.<sup>74</sup> Ülkemizde endemik olan *bla<sub>OXA-48</sub>*, yapılan çalışmalarda halen en sık saptanan karbapenemaz enzimidir.<sup>51, 52, 53, 61, 71</sup> Ülkemizden sonra Lübnan, Tunus, Mısır, Fas ve Senegal de dahil olmak üzere Akdeniz bölgesi boyunca yayılmıştır. OXA-181 enzimi OXA-48’in Hindistan’daki en yaygın varyantıdır. Kuzey Amerika’da sporadik vakalar bildirilmekle birlikte Kanada’dan hiç vaka bildirilmemiştir.<sup>64</sup> Avrupa’da da OXA-48 prevalansı artmıştır. Sporadik olguların yanı sıra, bu enzimi taşıyan izolatlar ile Belçika, Fransa, Yunanistan, Hollanda ve İspanya’da salgınlar meydana geldiği bildirilmiştir.<sup>8, 75</sup> “SENTRY” antimikrobiyal sürveyans programı enzimin görülme sıklığının 2007’de %3 olarak bildirmişken, 2009’da %27’ye yükseldiğini rapor etmiştir.<sup>76</sup> OXA tipi enzimlerin sayısı günümüzde 498’e ulaşmıştır.<sup>40</sup>

## 2.5. Karbapenemazların laboratuvar tanısı

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların karbapenem MİK değerleri karbapenemaz enzim tipine, düzeyine ve bakterinin türüne göre değişiklik gösterebilir. Ayrıca, GSBL ve AmpC gibi beta-laktamazların üretimi, azalmış permeabilite ve atım pompası gibi diğer direnç mekanizmalarının varlığı da değerlerde çeşitliliğe neden olabilir.<sup>37</sup> Karbapenemaz üreten enterik bakterilerde karbapenem MİK değerleri dirençli kabul edilen klinik sınır değerinin altında olabilir. Bu nedenle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) karbapenem duyarlılığında azalmanın belirlenmesi için tarama eşik değerlerinin kullanılmasını önermektedir.<sup>33</sup>

Ana karbapenemazları eksprese eden enterik bakterilerde karbapenemler için MİK değerleri dağılımı 3.Çizelge’de, “EUCAST” önerilerine göre karbapenemaz üreten enterik bakteriler için sınır değerler ve tarama eşik değerleri ise 4.Çizelge’de gösterilmiştir.

Karbapenem MİK değerlerinden ayrı olarak diğer beta-laktam antibiyotikler için MİK değerlerinin incelenmesi de, karbapenemaz üreten mikroorganizmaların saptanmasında yardımcı olabilir. Bir suşun karbapenemaz ürettiği olması, karbapenem direnç düzeyinden bağımsız olarak birçok beta laktam grubu antibiyotikte duyarlılık kaybıyla kendini gösterebilir. Karbapenemaz üreten bir suş en azından penisilinlere ve dar spektrumlu sefalosporinlere direnç gösterir. İzolat Sınıf A ya da Sınıf B karbapenemazlardan birine sahipse, seftazidim, seftriakson ve sefotaksim gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere de direnç beklenirken, Sınıf D karbapenemazların varlığında direnç beklenmez.<sup>77</sup>

Karbapenemaz üreten suşlar tarama sonrasında şüpheli bulunduğu takdirde, uygun fenotipik ve genotipik yöntemler ile doğrulanmalıdır. İzolatlarda karbapenemaz varlığı doğrulanabileceği gibi, karbapenem direncinin başka mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıkması da mümkündür.<sup>33</sup> Ayrıca *Proteus spp.*, *Providencia spp.* ve *Morganella morganii*’de intrinsek olarak imipenem MİK değerleri yüksek olma eğilimindedir.

Her iki kılavuzda da (*CLSI* ve *EUCAST*) karbapenemaz üretiminin doğrulanması sadece enfeksiyon kontrolü ya da epidemiyolojik araştırma amaçlarıyla önerilmekte, bakteri karbapenemaz ürettiği olsa bile klinik sınır değerlere göre belirlenen duyarlılık kategorilerinde herhangi bir değişiklik yapılmaması gerektiği bildirilmektedir.<sup>33, 78</sup>

3.Çizelge. Ana karbapenemazları eksprese eden enterik bakterilerde karbapenemler için MİK değerleri dağılımı.<sup>39</sup>

Karbapenemazlar	MİK (mg/L)		
	İmipenem	Meropenem	Ertapenem
KPC (Ambler Sınıf A)	0.5 ile > 32	0.5 ile > 32	0.5 ile > 32
IMP/VIM/NDM (Ambler Sınıf B)	0.5 ile > 32	0.5 ile > 64	0.38 ile >32
OXA-48 (Ambler Sınıf D)	0.25 ile > 64	0.5 ile > 64	0.38 ile >32

4. Çizelge. “EUCAST” önerilerine göre karbapenemaz üreten enterik bakteriler için sınır değerler ve tarama eşik değerleri.<sup>33</sup>

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk difüzyon zon çapları (mm) (10 µg disklerle)	
	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri	S/I sınır değeri	Tarama eşik değeri
Meropenem	≤ 2	> 0.12	≥ 22	< 25
İmipenem	≤ 2	> 1	≥ 22	< 23
Ertapenem	≤ 0.5	> 0.12	≥ 25	< 25

*EUCAST*, karbapenemaz taramasında duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi olan meropenemin kullanımını önermektedir. Ertapenem mükemmel duyarlılıkta olsa da özellikle *Enterobacter spp.*'de, porin kaybıyla birlikte GSBL veya AmpC β-laktamazların varlığında, düşük stabilitesi nedeniyle özgüllüğü zayıftır.<sup>39</sup> Ancak karbapenemaz üretiminin çoğunlukla düşük düzeyde olması nedeniyle suşların %60 kadarında

meropenem ve imipenem için MİK değerleri duyarlı sınırlar arasında yer almaktadır. Bu nedenle karbapenemaz aktivitesinin fenotipik olarak belirlenmesinde tarama amacıyla “CDC”ertapenem kullanılmasını önermektedir.<sup>79</sup>

## **2.5.1. Karbapenemaz varlığını doğrulama yöntemleri**

### **2.5.1.1. Fenotipik yöntemler**

Rutin duyarlılık testlerinde karbapenemlere duyarlılığın azaldığı belirlendiğinde, karbapenemazların saptanması için fenotipik yöntemlerin uygulanması önerilmektedir.<sup>33</sup>

Modifiye Hodge Testi (MHT), inhibitör tabanlı testler, kromojenik besiyerleri, Carba NP test, immünokromatografik yöntemler ve Matrix Assisted Laser Desorption/ionization Time of Flight Mass Spektrometry (MALDI-TOF MS) karbapenemazların saptanmasında uygulanan fenotipik doğrulama yöntemleri arasında yer almaktadır.<sup>35</sup>

#### **2.5.1.1.1. Modifiye Hodge Testi**

Karbapenemaz üreten suşların, testte kullanılan karbapenemi inhibe etmesi sonucunda indikatör suş olarak kullanılan duyarlı standart suşun (*E.coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922) inhibisyon zonundaki değişikliği yorumlamayı esas alan bir testtir. “EUCAST” tarafından duyarlılık ve özgüllüğü düşük olduğu ve yorumlanması güç olduğu için önerilmemektedir.<sup>33, 35</sup>

#### **2.5.1.1.2. İnhibitör tabanlı testler**

Spesifik karbapenemaz inhibitörlerinin varlığında, belirli karbapenemazların aktivitesi azalır ve karbapenemaz üreten suşlar, beta laktamlara daha duyarlı olarak saptanır.<sup>80</sup> Bu inhibitörlerle yapılan fenotipik testlerde, tek başına karbapenem ile karbapenem-karbapenemaz inhibitör kombinasyonları karşılaştırılarak, inhibisyon zon çapında artış ya da MİK değerlerinde düşme olup olmaması değerlendirilir.<sup>81</sup>

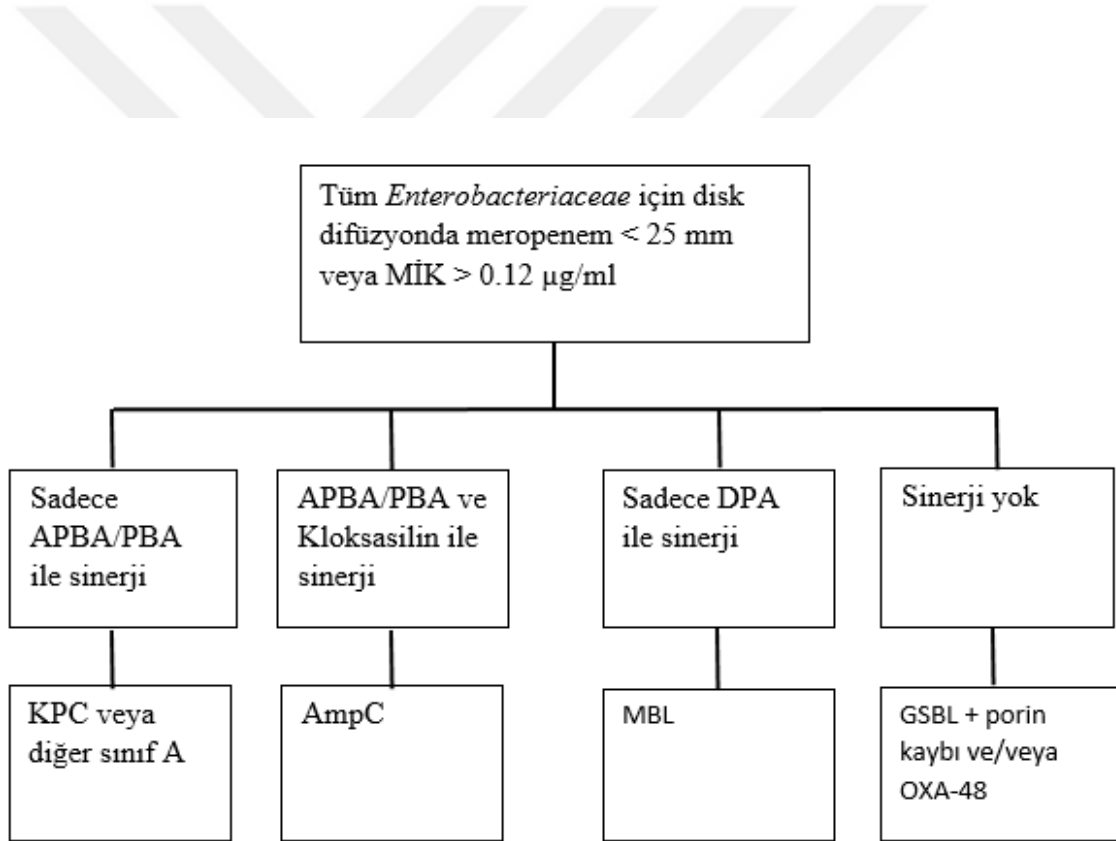
Kombine disk testlerinde, ticari olarak elde edilebilen EDTA, DPA, Fenil Boronik Asit (PBA) ya da kloksasilin gibi inhibitör emdirilmiş meropenem diskleri kullanılır. Test edilecek izolat Mueller-Hinton agar ekildikten sonra meropenem diski ile inhibitör emdirilmiş meropenem diski yerleştirilir. İnkübasyonu takiben zon çapları ölçülerek sinerji olup olmadığı incelenir. DPA ya da EDTA ile sinerji MBL üretimi, Aminofenil Boronik Asit (APBA) ya da PBA ile sinerji KPC üretimi, kloksasilin ile sinerji ise AmpC üretimi lehine yorumlanır. Sinerji gözlenmemesi durumunda GSBL+porin kaybı ve/veya OXA-48

üretimi düşünülebilir.<sup>35</sup> KPC ve MBL enzimlerinin birlikteliği de sinerji gözlenmemesine neden olabilir. Ancak bu durumda karbapenemlere yüksek düzey direnç gözlenir.<sup>33</sup>

İnhibitör testlerin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması 1.Çizim’de gösterilmiştir.

Metallo beta-laktamaz aktivitesini saptamak için inhibitör tabanlı bir diğer test de, imipenem ve imipenem/EDTA kombinasyonlarını içeren gradiyent strip testidir.<sup>35, 39</sup>

Özetle, Sınıf A karbapenemazlar boronik asit ile, Sınıf B karbapenemazlar dipikolinik asit ve EDTA ile inhibe olur. Sınıf D karbapenemazların rutin laboratuvarında kullanılan bir inhibitörü bulunmamaktadır. Kloksasilin, Amp-C beta laktamazları inhibe ettiğinden, AmpC aşırı üreticisi suşlar ile karbapenemaz üreticilerini ayırt etmek amacıyla eklenir.<sup>33</sup>



1.Çizim. İnhibitör testlerin yorumlanmasıyla ilgili akış şeması<sup>33</sup>

### 2.5.1.1.3. Karbapenem içeren kromojenik besiyerleri

Daha çok klinik örnek ve rektal sürüntülerde tarama amaçlı kullanılan, GP ve karbapenemaz üretmeyen GN bakterilerin üremesini inhibe eden spesifik ajanlar içeren ve

türleri koloni rengi ile ayırt eden besiyerleridir. SUPERCARBA, CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Fransa), Oxoid Brilliance CRE agar (Thermofisher Scientific, UK) bilinen ticari testlerdendir.<sup>82</sup>

#### **2.5.1.1.4. Carba NP testi**

Karbapenemlerin, test edilen bakteri tarafından hidrolizi esası üzerine kurulmuş, hızlı, duyarlı, özgül ve herhangi bir laboratuvara adapte edilebilecek kullanışlı bir biyokimyasal test olarak görülmektedir. Karbapenem hidrolizi sonucu oluşan pH değişimi ile indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısı solüsyonunun rengi kırmızıdan sarıya dönmekte ve bu durum pozitif sonuç olarak değerlendirilmektedir.<sup>33, 83</sup>

#### **2.5.1.1.5. Karbapenem inaktivasyon metodu**

Test edilecek izolat, karbapenem emdirilmiş disk ile birlikte inkübasyona bırakılır. Karbapenemin bakterinin enzimiyle inaktive olması ve bunun fenotipik olarak gösterilmesi esasına dayanır. Serum fizyolojik (SF) ile hazırlanan şüpheli bakteri süspansiyonu meropenem diskiyle iki saat inkübasyona bırakılır. İki saatin sonunda süspansiyon içindeki disk alınır ve karbapenem duyarlı standart suşun (*E.coli* "ATCC" 25922) yayıldığı MHA plağına konulur. Altı saatlik inkübasyon sonrasında normalde duyarlı suşun etrafında inhibisyon zonu oluşması beklenirken, test edilen bakteride karbapenemaz varsa meropenem diski inaktive olmuştur ve duyarlı suşta inhibisyon zonu oluşturamaz. Bu yöntemde bakteri miktarı, inkübasyon süreleri, disk içeriği gibi değişkenlerin standardize edilmeleri için çalışmalar gerekmektedir.<sup>35, 84</sup>

#### **2.5.1.1.6. MALDI-TOF MS**

Lazer ile küçük kütlelere ayrılan ve iyonize olan moleküllerin uçuş paterninin analizine dayanan bu yöntemle, bakteride karbapenemaz varlığında karbapenem hidrolizi sonucu oluşan ürünlerin analizi ile kısa sürede karbapenemaz üretimi saptanabilmektedir.<sup>35</sup> Test ile ilgili optimizasyon testleri devam etmekle birlikte laboratuvarlarda geniş kullanım alanı bulamamıştır.<sup>85</sup>

#### **2.5.1.1.7. İmmünokromatografi**

Kromatografik kağıtta sabitlenmiş antikor/antijenle örnekte bulunan antijen/antikorun birleşmesi ile oluşan immun kompleks, kağıtta renk değişimi oluşturmakta ve antijen ya da antikor varlığı test edilebilmektedir. Bu yöntem, karbapenemaz enzimlerine karşı

geliştirilmiş monoklonal antikorlar sayesinde karbapenemaz saptanmasının test edilmesinde de kullanım alanı bulmuştur.<sup>35, 86</sup>

### **2.5.2. Genotipik yöntemler**

Duyarlılık ve özgüllüğün yüksek olduğu, hızlı ve fenotipi etkileyen faktörlerden korunmuş yöntemler olan genotipik yöntemler artık daha sık kullanılır durumdadır.<sup>35</sup> Ancak maliyetlerinin daha yüksek oluşu, eğitilmiş teknisyene ihtiyaç duyulması ve tanımlanmamış nadir genleri saptayamaması dezavantajlarıdır. Ayrıca, hasta tedavisi açısından ya da salgınları önlemek açısından karbapenemaz tipinin kesin olarak tanımlanması gerekmektedir.<sup>36</sup> Karbapenemaz kodlayan genlerdeki yüksek çeşitlilik ve artan sayıdaki yeni varyantlar nedeniyle karbapenem dirençli bir suşta elde edilen negatif polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) sonucu, bir referans laboratuvarında ilave genotipik analizlerle yeniden değerlendirilmelidir.<sup>35</sup>

Karbapenemazların primerlerinin bulunması halinde tek ya da çoklu olarak klasik ve gerçek zamanlı PZR kullanılarak VIM, KPC, IMP, NDM, OXA-48 gibi yaygın görülen karbapenemaz genleri 40 dk-6 saat gibi kısa zamanda yüksek duyarlılık ve özgüllükte tespit edilebilmektedir.<sup>35</sup>

Karbapenemaz gen tiplerinin tayini için PZR ve hibridizasyon bazlı ticari kitler de [Hyplex MBL ID, Hyplex CarbOxa ID kits (BAG Health Care, Almanya)] piyasada bulunmaktadır.<sup>87</sup> Karbapenem direnç genlerini hızlı ve güvenilir olarak saptayan genotipik yöntemler listesine son olarak microarray teknolojisi eklenmiştir. Check KPC/ESBL microarray ve genişletilmiş versiyonu Check-MDR CT102 (Check-Points Health BV, Hollanda) klinikte en sık karşılaşılan karbapenemaz genleri de dahil pek çok geni tek bir tüp içinde başarı ile saptamaktadır.<sup>88, 89</sup>

### **2.6. Pulse Field Gel Elektrofrezisi**

Bakteriyel izolatlar arasındaki klonal ilişkilerin belirlenmesinde, biyotiplendirme, serotiplendirme, antibiyotik duyarlılıklarına göre tiplendirme, bakteriyofaj tiplendirmesi gibi fenotipik yöntemler yerini ribotiplendirme, plazmid incelemesi, PZR temelli ve Pulse Field Gel Elektrofrezisi (PFGE) gibi moleküler tiplendirmeye bırakmıştır.<sup>90</sup>

PFGE, birçok mikroorganizma için halen altın standart olarak kullanılan genotiplendirme yöntemidir. Epidemiyolojik açıdan ayırım gücü yüksek ve kısa süreli



salgınları incelemede değerli bir yöntemdir.<sup>91, 92</sup> Bu yöntemde bakteriler, kromozomal DNA'nın kırılmasını önlemek için bir agaroz jele gömülür ve DNA izolasyonu agaroz içerisinde yapılır. Bakteri kromozomu, 6-8 nükleotidlik spesifik DNA dizilerini tanıyan nadir kesen bir restriksiyon enzimi ile kesilir ve çeşitli uzunluklarda sınırlı sayıda DNA parçaları elde edilir. DNA kesiminden sonra agaroz blokların 1/3'ü kesilerek agaroz jel matrisinin kuyucuklarına yüklenir. Büyük boyutlarda (megabaz) olan DNA parçalarının konvansiyonel agaroz jel elektroforeziyle ayrılması olanaksızdır. Bununla birlikte periyodik olarak, yeniden yönlendirilmiş bir elektrik alanı uygulanarak, farklı boyutlardaki DNA moleküllerinin agaroz jel matrisindeki gözenekler boyunca zikzak şeklinde ilerlemesi sağlanır. Bu sayede küçük DNA moleküllerinin daha büyük olanlardan hızlı hareket etmesi ile kilobazlardan megabazlara kadar değişen boyutlarda çeşitli DNA parçacıkları ayrıştırılır. PFGE'nin “*OFAGE*” (Orthogonal-Field Alternation Gel Electrophoresis), “*FİGE*” (Field-Inversion Gel Electrophoresis), “*TAFE*” (Transverse-Alternating Field Gel Electrophoresis), “*CHEF*” (Contour-Clamped Homogeneous Electric Fields) gibi benzer stratejiyi temel alan farklı alt tipleri vardır. Laboratuvarlarda en çok kullanılan tip “*CHEF*”tir. Bu sistem, bir altıgen düzeninde 24 elektrottan oluşur ve sabit bir elektroforez gradyanı üretir, bu da birincil elektrotlardan agaroz jelinin merkezine 60° açı ile yerleştirilen ikincil elektrotlara geçer. Sonuç olarak, bu konfigürasyon, DNA moleküllerinin 120° açıyla agaroz jel matrisinde yön değiştirmelerine ve yaklaşık 15-30 saatlik elektroforez süresinde farklı boyutlu fragmanların ayrılmasına imkân verir. Elektroforez sonrası, jel etidiyum bromür ile boyanarak ultraviyole ile görüntülenir. Oluşan bant profilleri incelenerek izolatlar arasındaki benzerlik araştırılır.<sup>93, 94</sup> İzolatlar arası klonal ilişkinin değerlendirilmesinde ise bant farkı olmayan suşların ayırtedilemez; tek bir genetik olayla 2-3 arası bant farklılığı gösteren suşlar yakından ilişkili; iki genetik değişikliği temsil eden 4-6 bant farkı olan izolatların muhtemel yakından ilişkili ve üç veya daha fazla genetik değişikliği temsil eden  $\geq 7$  bant farkı olan suşların ise farklı tipler olarak yorumlanması önerilmektedir.<sup>90, 91</sup>

Çalışılan izolat sayısı arttıkça PFGE profillerini değerlendirmenin zorlaşması nedeniyle elektroforez görüntüleri bilgisayar programları ile yorumlanabilir. Sıklıkla kullanılan bilgisayar programları; Gel-Compar (Applied Systems, Belçika), Dendron (Solltech, Oakdale, Iowa), Diversity Database Fingerprinting Software (BioRad), Gene Profiler

(Scanlytics, Fairfaz, Va), Phoretix 1-D (Nonlinear, ABD, Durham, N.C.), Taxotron  
(Taxolab Institut Pasteur, Fransa)'dur.



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Çalışmaya alınan izolatlar

Ocak 2015 ile Şubat 2017 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji Birimi'ne gelen çeşitli klinik örneklerden izole edilip, Vitek-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile tür tayini ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış olan, karbapenem (ertapenem, meropenem, imipenem) grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı ya da dirençli olarak saptanan 100 adet *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı.<sup>95</sup> Deneylerin tümü Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalı Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Suşlar çalışmaya başlanacağı güne kadar %15 gliserol içeren TSB (Merck, Almanya) besiyeri içerisinde -80°C'de saklandı. Her hastadan tek suş çalışmaya dahil edildi.

Eş zamanlı olarak "Epidemiyolojik Hasta Formu (1.Ek.)" ile suşların izole edildiği hastalara ait çeşitli veriler hastane bilgi sistemindeki epikrizler taranarak, CDC tanı kriterlerine göre HK enfeksiyon-TK enfeksiyon ayrımı yapıldı.<sup>96</sup>

#### 3.2. Referans suşlar

Kalite kontrol amacıyla, biyokimyasal testlerde *E. coli* "ATCC" 25922 ve *K. pneumoniae* "ATCC" 700603, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde ise *E. coli* "ATCC" 25922 kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonlarında, Prof.Dr. Özgen ESER'den temin edilen *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>IMP</sub> genlerini içeren pozitif kontrol suşları kullanıldı. *Staphylococcus aureus* National Collection of Type Cultures (NCTC) 8523 suşu kullanılarak hazırlanan agaroz kalıp, *Sma*I enzimi ile kesim yapıldıktan sonra PFGE'de moleküler büyüklük standardı olarak kullanıldı.

#### 3.3. Antibiyotikler

Bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla disk difüzyon yöntemi için Amoxicillin-Clavulanic Acid (Oxoid 20/10 µg), Piperacillin-Tazobactam (Oxoid 30/6 µg), Trimethoprim sulphamethoxazole (Oxoid 1.25/23.75 µg) diskleri, agar dilüsyon yöntemi için Ertapenem sodium (Sigma SML 1238 – 10 mg ), Meropenem trihydrate (Sigma M2574- 10 mg ), İmipenem monohydrate (Sigma I0160- 5 mg), Colistin sülfate salt (Sigma C4461- 100 mg, potens ≥ 15.000 U), Ampisilin sodyum (Ampisina 500 mg, potens % 93,6, Mustafa Nevzat), Seftazidim pentahidrat + sodyum karbonat (Fortum 1 g, potens %88,2, GSK ), Sefotaksim sodyum (Sefotak 500 mg, potens %89,7, Zentiva ),

Amikasin sülfat (Amikozit 500 mg/2 ml, Zentiva ), Gentamisin sülfat (Genta 160 mg/2 ml, İbrahim Ethem Ulugay ), Ciprofloksasin laktat (Flotic 200 mg/100 ml, VEM), Tigesiklin (Tygacil 50 mg/5 ml, Pfizer) kullanıldı.

Kolistin potensi, “CLSI” önerileri doğrultusunda 30,000 U %100 potens kabul edilerek hesaplandı ve %50 kabul edildi.<sup>78</sup> Ertapenem (ETP), meropenem (MEM) ve imipenem (İPM) %100 potens kabul edildi. Ampisilin (AMP), seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) ticari formlarından yardımcı maddeler düşülerek potens hesabı yapıldı.

Tartılacak antibiyotik miktarı:

Ağırlık (mg): Hacim(ml) X Konsantrasyon (µg/ml) / Potens formülüne göre hesaplandı.<sup>97</sup>

### **3.4. Besiyerleri, ayraçlar ve tampon çözeltilerin hazırlanması**

#### **3.4.1. Eozin – Metilen Blue (EMB) agar**

EMB agar (Merck, Almanya), ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı ve 121°C’de 15 dakika steril edilip 45–50°C’ye kadar soğutuldu. Aseptik şartlarda 20 ml besiyeri, plastik petrilere döküldü ve kullanılına kadar +4°C’de saklandı.

#### **3.4.2. Gliserol (%15) içeren triptik soy buyyon (TSB)**

Triptik soy buyyon (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Besiyerinin %15’i gliserol (Merck, Almanya) içerecek şekilde su miktarı hesaplandı. 121°C’de 15 dakika sterilizasyon işleminin ardından aseptik şartlarda steril 1.5 ml’lik ependorf tüplerine 1 ml besiyeri dağıtıldı.

#### **3.4.3. Mueller – Hinton agar (MHA)**

Mueller – Hinton agar (Merck, Almanya), ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı ve 121°C’de 15 dakika steril edilip 45–50°C’ye kadar soğutuldu. Aseptik şartlarda 20 ml besiyeri, plastik petrilere döküldü ve kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

#### **3.4.4. Üç şekerli besiyeri**

Triple Sugar Iron (TSI) Agar (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Eritildikten sonra, cam deney tüplerine

12 ml besiyeri dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatıldı. 121°C’de 15 dakika steril edildi. Sterilizasyon işlemi ardından 1/3’ ü dipte, 2/3’ ü yatık olacak şekilde katılaşmaya bırakıldı.

#### **3.4.5. Sülfid – indol – hareket besiyeri**

Sulfide – Indol – Motility (SIM) Medium (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Eritildikten sonra, cam deney tüplerine 5 ml besiyeri dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatıldı. 121°C’de 15 dakika steril edilip dik olarak katılaşmaya bırakıldı.

#### **3.4.6. Metil kırmızısı – Voges Proskauer besiyeri**

Methyl Red–Voges Proskauer (MR–VP) Medium (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Eritildikten sonra, cam deney tüplerine 5 ml besiyeri dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatıldı. 121°C’de 15 dakika steril edildi.

#### **3.4.7. Simmons sitrat agar**

Simmons Citrate Agar (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. Eritildikten sonra, cam deney tüplerine 5 ml besiyeri dağıtılıp, ağızları pamuk ile kapatıldı. 121°C’de 15 dakika steril edilip tamamı yatık bir şekilde katılaşmaya bırakıldı.

#### **3.4.8. Üreaz besiyeri**

Christensen urea agar base (Merck, Almanya) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı. 121°C’de 15 dakika steril edilip, 45–55°C’ye geldiğinde litreye 50 ml olacak şekilde %40’lık steril üre solüsyonu (Merck, Almanya) ilave edildi. Steril cam deney tüplerine 5 ml olacak şekilde dağıtılıp, tamamı yatık bir alan oluşturacak şekilde katılaşmaya bırakıldı.

#### **3.4.9. Tampon çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması**

Tampon çözeltiler ve reaktifler 5.Çizelge’de gösterildikleri şekilde hazırlandı.

5.Çizelge. Tampon çözeltilerin ve reaktiflerin hazırlanması.

Tampon çözelti – reaktif adı	Konsantrasyonu ve miktarı	Hazırlanışı
Üre Solüsyonu	%40, 100 ml	90 ml distile su içinde 40 g üre çözüldü. 100 ml'ye tamamlanıp, 0,2 µm'lik filtre ile steril edildi.
Metil Kırmızısı Ayıracı	125 ml	0,025 g Metil kırmızısı 75 ml %96'lık etil alkol içerisinde çözülp, 50 ml distile su eklendi.
α – Naftol	% 5, 100 ml	5 g α-naftol, 100 ml %96'lık etil alkol içinde çözüldü.
Potasyum Hidroksit (KOH)	% 40, 100 ml	95 ml distile suda 40 g potasyum hidroksit (KOH) çözülp, 100 ml'ye tamamlandı.
Kovac's Ayıracı	200 ml	150 ml İzöamil alkol içerisinde 10 g p-dimetil amino benzaldehit ilave edildi. Üzerine 50 ml %37'lik hidroklorik asit (HCl) eklendi.
0,5 McFarland Standardı	100 ml	0.048 mol/l'lik baryum klorür (BaCl <sub>2</sub> ) çözeltisinden 0,5 ml ve 0,18 mol/l'lik sülfürik asit çözeltisinden 99,5 ml karıştırıldı.
Tris (pH: 8.0)	1M, 500 ml	60.57 g Tris tartularak 450 ml distile suda çözüldü. %37'lik hidroklorik asit (HCl) ile pH 8,0'a ayarlandı. 500 ml'ye tamamlanıp steril edildi.
EDTA (pH 8.0)	0.5 M, 500 ml	73.06 g EDTA tartılıp 450 ml distile suda 60°C'de sodyum hidroksit (NaOH) eklenerek çözüldü. pH 8.0 olduğunda NaOH eklenmesi durduruldu. 500 ml'ye tamamlanarak steril edildi.
TE (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0)	2000 ml	20 ml Tris (1 M, pH 8.0) ve 4 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) 1976 ml distile suda karıştırılıp steril edildi.

5. Çizelge devamı.

<b>Tampon çözelti – reaktif adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
TBE	10 X, 1200 ml	129,6 g Tris, 66 g borik asit ve 48 ml EDTA (0,5 M pH 8,0) 1000 ml distile suda çözüldü. 1200 ml'ye tamamlanarak steril edildi.
Hücre süspansiyon solüsyonu (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0)	1000 ml	100 ml Tris (1 M, pH 8.0), 200 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) 700 ml steril distile su ile karıştırıldı.
Sarkozil	% 10, 100 ml	10 g Sarkozil (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt) tartılıp, 80 ml distile suda çözülerek 100 ml'ye tamamlandı. 0,2 µm'lik filtre ile steril edildi.
Hücre parçalama solüsyonu (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + % 1 Sarkozil + 0.1 mg/ml proteinaz K)	1000 ml	50 ml Tris (1 M, pH 8.0), 100 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) ve 100 ml % 10 Sarkozil (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt) 750 ml steril distile su ile karıştırıldı. Çalışma anında gereken miktarda solüsyona, kullanımdan hemen önce, son konsantrasyon 0.1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (100 mg/ml) eklendi.
Kesim tamponu (1X tango buffer, 30 U <i>Xba</i> I )	2 ml	220 µl 10 X tango buffer, 30 µl <i>Xba</i> I enzimi (10 U/µl) steril çift distile su ile 2 ml'ye tamamlandı. Tampon buz üzerinde her defasında kullanımdan hemen önce taze olarak hazırlandı.

### 3.4.10. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması

Antibiyotik stok çözeltileri 6.Çizelge’de gösterildikleri şekilde hazırlandı.

6.Çizelge. Antibiyotik stok çözeltilerinin hazırlanması.

Antibiyotik adı	Stok konsantrasyonu	Hazırlanışı
Ertapenem (ETP)	1280 µg/ml	7.68 mg ETP toz etken madde tartılarak 6 ml steril distile su ile çözüldü
Meropenem (MEM)	1280 µg/ml	7.68 mg MEM toz etken madde tartılarak 6 ml distile su ile çözüldü
İmipenem (İPM)	1280 µg/ml	7.68 mg İPM toz etken madde tartılarak 6 ml steril distile su ile çözüldü
Kolistin (KOL)	640 µg/ml	30.72 mg KOL toz etken madde tartılarak 24 ml steril distile su ile çözüldü
Ampisilin (AMP)	1280 µg/ml	8.2 mg AMP toz tartılarak 6 ml steril distile su ile çözüldü
Seftazidim (CAZ)	640 µg/ml	8.7 mg CAZ toz tartılarak 12 ml steril distile su ile çözüldü
Sefotaksim (CTX)	640 µg/ml	17.11 mg CTX toz tartılarak 24 ml steril distile su ile çözüldü
Amikasin (AK)	2560 µg/ml	61.4 µl AK çözeltisi alınıp steril distile su ile 6 ml’ye tamamlandı.
Siprofloksasin (CİP)	640 µg/ml	1.9 ml CİP çözeltisi alınıp steril distile su ile 6 ml’ye tamamlandı.
Tigesiklin (TG)	640 µg/ml	384 µl TG çözeltisi alınıp steril distile su ile 6 ml’ye tamamlandı.
Gentamisin (CN)	640 µg/ml	48 µl CN çözeltisi alınıp steril distile su ile 6 ml’ye tamamlandı.



### **3.5. Saklamadan çıkarılan örneklerin çalışılması**

Çalışılacak örnekler, -80°C'den çıkartılarak EMB agara aseptik şartlarda tek koloni düşürme yöntemi ile pasajlandı. 36°C'de 18 saat inkübasyon sonunda, tek düşmüş kolonilerden EMB agara ikinci pasaj alındı. Aynı süre ve sıcaklıkta inkübasyon sonunda, konvansiyonel yöntemlerle tür tanımlamaları yapıldı.

#### **3.5.1. Tanımlamada kullanılan biyokimyasal testler**

Kullanılan biyokimyasal testler 7.Çizelge'ye göre yorumlandı.

##### **3.5.1.1. Üç şeker testi**

Tek koloniden iğne öze ile dip kısma batırma, özeyi tüp içerisinden çıkarmadan yüzey kısmına çizgi ekim yapıldı. Tüpler 36°C'de 18 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda tüpler gaz oluşumu, laktoz ve/veya sukroz fermentasyonu, glukoz fermentasyonu ve hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşumu yönünden değerlendirildi. Dip sarı-yüzey sarı glukoz-laktoz ve/veya sukroz fermentasyonu pozitif, dip sarı yüzey kırmızı glukoz fermentasyon pozitif, laktoz ve/veya sukroz fermentasyonu negatif olarak değerlendirildi.<sup>10</sup>

##### **3.5.1.2. İndol ve hareket testi**

EMB agarda üremiş bir koloniden, SIM besiyerine iğne öze ile batırma ekimi yapıp 36°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerinde önce hareket, ardından indol reaksiyonu değerlendirildi.

Ekim çizgisi dışına yayılan bir üreme hareket testi pozitif, sadece ekim çizgisinde olan üreme ise negatif olarak değerlendirildi.

İndol testi için, tüp içerisine 4-5 damla Kovac's Ayırıcı damlatıldı. Damlatılan çözeltilinin kırmızı renk vermesi indol pozitif, renk değişikliği olmuyorsa negatif olarak değerlendirildi.

SIM besiyerinde H<sub>2</sub>S oluşumu da değerlendirilebilir. H<sub>2</sub>S pozitifliğinde siyah renk görülürken, negatiflikte renk değişimi görülmez.<sup>10</sup>

##### **3.5.1.3. Metil kırmızısı testi**

MR – VP besiyerine tek koloniden halka öze ile ekim yapıp 36°C'de 18 saat inkübe edildi. Teste başlamadan önce, Voges-Proskauer testi için kültür sıvısından 1 ml ayrıldı. Metil kırmızısı ayırıcından 5 damla kültür sıvısına damlatıldı. Kırmızı renk oluşumu pozitif, turuncu ve sarı renk negatif olarak değerlendirildi.<sup>10</sup>

#### 3.5.1.4. Voges – Proskauer testi

MR-VP besiyerinden ayrılan 1 ml kültür sıvısı üzerine, 0,6 ml %5  $\alpha$ -naftol, ardından 0,2 ml %40 KOH damlatılarak, oksijenlenmesi için tüpler hafifçe çalkalandı. En geç 30 dakika içerisinde kırmızı renk görülen izolatlar pozitif, renk değişimi olmayanlar negatif olarak değerlendirildi.<sup>10</sup>

#### 3.5.1.5. Sitrat kullanım testi

Simmon'un sitrat besiyerine tek koloniden iğne öze ile çizgi ekim 36°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerinin yeşil olan renginin maviye dönmesi veya sadece üreme olması pozitif, besiyeri renginin yeşil kalması veya üreme olmaması negatif olarak değerlendirildi.<sup>10</sup>

#### 3.5.1.6. Üreaz testi

Üre besiyerine tek koloniden iğne öze ile çizgi ekim yapılarak 36°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda besiyerinin sarı olan renginin pembeye dönmesi pozitif, renk değişikliği olmaması negatif olarak değerlendirildi.<sup>10</sup>

7.Çizelge. *K.pneumoniae* tanımlamasında kullanılan çeşitli biyokimyasal testler ve pozitiflik yüzdeleri.<sup>10</sup>

Üç Şekerli Besiyeri											
	Glu	Lak	Suk	Gaz	H <sub>2</sub> S	İndol	M-R	V-P	Sitrat	Üre	Hareket
<i>K.pneumoniae</i>	%100	%98	%100	%97	%0	%0	%10	%98	%98	%95	%0

#### 3.6. Antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesi

İzolatların Amoksisilin/ klavulanik asit (AMC), piperasilin/ tazobaktam (TZP) ve trimetoprim/ sülfometaksazol (SXT) duyarlılıklarını belirlemek için Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Diğer antimikrobiyallere olan duyarlılıklarını belirlemek için ise agar dilüsyon yöntemi ile MİK değerleri saptandı.

### 3.6.1. Disk difüzyon yöntemi

*EUCAST* önerilerine göre çalışılan antibiyotiklerin, disk içerikleri ve duyarlılık sınır değerleri 8.Çizelge’de belirtildiği gibidir.

Belirlenen antimikrobiallerin her bir suş için duyarlılıkları Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi ile saptanıp, “*EUCAST*” 2016 sınır değerlerine göre değerlendirildi.<sup>98, 99</sup>

Saklamadan çıkartılıp 2 kez pasajlanan izolatların 18 saatlik taze kültürü kullanıldı. Pamuklu steril eküvyon çubuk ile alınan 2-3 adet koloni, 3 ml SF içerisinde süspanse edilip, 0,5 McFarland standart değerinde bakteri süspanasyonu hazırlandı.

Bakteri süspanasyonu pamuklu steril eküvyon çubuk yardımı ile MHA besiyeri yüzeyine 3-5 farklı yönde yayıldı. Antimikrobiyal madde içeren diskler penset vasıtası ile aseptik şartlarda besiyerine yerleştirildi. Bu şekilde hazırlanan petripler 36°C’de 18 saat inkübe edildi. Kontrol olarak, *E. coli* “ATCC” 25922 standart suşu kullanıldı. Standart suşun duyarlılık sınırları beklenen değerler içerisinde ise test değerlendirildi.

İnkübasyon süresi sonunda, zon çapları cetvel yardımı ile milimetre (mm) cinsinden ölçülerek 8.Çizelge’de belirtilen “*EUCAST*” sınır değerlerine göre duyarlı, orta duyarlı ve dirençli olarak değerlendirildi.

8.Çizelge. Disk difüzyon yöntemi ile çalışılan antibiyotikler ve zon çapı (mm) sınır değerleri.<sup>99</sup>

Antibiyotik	Disk İçeriği (µg)	Duyarlı (S) ≥	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R) <
Amoksisilin/ Klavulonik Asit	20/10	19	–	19
Piperasilin/ Tazobaktam	30/6	20	17 - 29	17
Trimetoprim/ Sulfametoksazol	1.25/ 23.75	16	13 - 15	13

### 3.6.2. Agar dilüsyon yöntemi

Belirlenen antimikrobiaların her bir suş için MİK değerleri agar dilüsyon yöntemi ile saptanıp, 9.Çizelge’de gösterilen “EUCAST” 2016 sınır değerlerine göre değerlendirildi.<sup>97,99</sup>

Bunun için “CLSI”<sup>78</sup>’de belirtildiği şekilde, 6.Çizelge’de gösterilen antibiyotik stok çözeltilerinden, steril distile su ile çift kat seri dilüsyon yapıp ara konsantrasyonlar elde edildi. Antibiyotik ara dilüsyonlarının 2 ml’si ayrı ayrı steril petri kutularına (100 mm çapında) aktarıldı ve üzerine otoklav sonrası 50-55°C’ye kadar soğutulmuş 18 ml steril MHA besiyeri ilave edilip iyice karışması sağlandı.

Her antibiyotik için “EUCAST” 2016 enterik bakteriler duyarlılık sınır değerinin 3 dilüsyon altı ve direnç sınır değerinin 3 dilüsyon üzerine çıkacak konsantrasyonda antibiyotikli agar besiyerleri hazırlandı. Besiyerinin yüzeyinin kuruması için oda ısısında 1-2 saat bekletildi. Böylece, her bir antibiyotik için ayrı ayrı 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 µg/ml aralığında değişen antibiyotikli besiyerleri hazırlanmış oldu (her konsantrasyondan 3 adet plak hazırlandı). Üreme kontrolü için antibiyotik içermeyen MHA besiyeri kullanıldı.

Antibiyotik MİK değerlerinin belirlenmesi için, 36°C’de 18 saatlik taze bakteri kültürlerinden bir öze dolusu bakteri kolonisi steril SF içinde süspansiyon edilerek yoğunlukları 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonları steril SF ile 1:10 oranında sulandırıldıktan sonra steril U tabanlı pleytlere, her kuyucukta farklı bir bakteri olacak şekilde aktarıldı. Böylece son inokulum, 10<sup>4</sup> CFU oldu. Agar plakları inokulumun yönünü gösterecek şekilde işaretlendi. 3 mm çapında iğneleri olan 2 µL damlatabilen replikatör, sulandırılmış bakteri süspansiyonu içeren pleyte batırıldı. Önce antibiyotik içermeyen üreme kontrol plağına inokülasyon yapıldı. Ardından en düşük konsantrasyonda antibiyotik içeren agardan başlayarak farklı antibiyotik konsantrasyonları içeren plaklara, her plakta 35 adet çalışma suşu ve kalite kontrol amacıyla 1 adet *E.coli* “ATCC” 25922 suşu inoküle edilmiş oldu.

Agar yüzeyindeki inokulumun kuruması beklendikten sonra plaklar 36°C’de 18 saat inkübe edildi. Plaklar MİK’lerin belirlenmesi amacıyla koyu renkli bir yüzey üzerinde incelendi. Üremeyi inhibe eden en düşük antibiyotik ilaç konsantrasyonu MİK olarak

kaydedildi. *E.coli* “ATCC” 25922 standart suşunun MİK değerlerinin “EUCAST” kalite kontrol tablosundaki beklenen sonuçlar ile uyumlu olup olmadığı kontrol edildi.

9.Çizelge. “EUCAST” *Enterobacteriaceae* antibiyotik MİK sınır değerleri.<sup>99</sup>

Antibiyotik	MİK sınır değeri (µg/ml)		
	Duyarlı (S) ≤	Orta Duyarlı (I)	Dirençli (R) >
Ampisilin	8	-	8
Seftazidim	1	2	4
Sefotaksim	1	2	2
Ertapenem	0.5	1	1
Meropenem	2	4	8
İmipenem	2	4	8
Kolistin	2	-	2
Tigesiklin	1	2	2
Amikasin	8	16	16
Gentamisin	2	4	4
Siprofloksasin	0.5	1	1

### 3.7. Karbapenemaz genlerinin multipleks PZR ile araştırılması

Multipleks PZR yöntemi ile klinik örneklerden sıklıkla izole edilen 5 adet karbapenemaz geni araştırılmıştır.

#### 3.7.1. Multipleks PZR için kullanılan primerler

Primerler, karbapenem direncinden en sık sorumlu olan genler dikkate alınarak seçilmiş olup iki farklı reaksiyon olarak multipleks PZR gerçekleştirildi.<sup>100</sup> Genlerin belirlenmesi için yapılan Multipleks PZR panel I ve II’de kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları, 10.Çizelge ve 11.Çizelge’de gösterildiği gibidir.

10.Çizelge. Multipleks PZR Panel I’de kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.

Primer Çifti	Primer Dizisi	Moleküler Ağırlık (baz çifti)
IMP-F	GGAATAGAGTGGCTTAAYTC	232
IMP-R	TCGGTTTAAAYAAAACAACCACC	
VIM- F	GATGGTGTTTGGTCGCATA	390
VIM-R	CGAATGCGCAGCACCAG	

F: Düz Primer, R: Ters Primer, Y: C ya da T.

11.Çizelge. Multipleks PZR Panel II’de kullanılan primer dizileri ve moleküler ağırlıkları.

Primer Çifti	Primer Dizisi	Moleküler Ağırlık (baz çifti)
OXA-48- F	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	438
OXA-48- R	CATCAAGTTCAACCCAACCG	
NDM- F	GGTTGGCGATCTGGTTTTTC	621
NDM-R	CGGAATGGCTCATCACGATC	
KPC- F	CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG	798
KPC- R	CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	

F: Düz Primer, R: Ters Primer.

Liyofilize halde gelen her bir primer dizisi (IONTEK), firmanın önerdiği miktarda steril saf su ile sulandırılarak 100 µM’lık stok primer çözeltileri elde edildi.

### 3.7.2. Deoksiribonükleik Asit izolasyonu

Karbapenemaz genlerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilecek PZR için DNA izolasyonu, kaynatma metodu ile gerçekleştirildi.<sup>101</sup>

Bakteriler tek koloni düşürme yöntemi ile EMB agara ekildi. Bu kültürden bir koloni, MHA besiyerine pasajlanarak 36°C’de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda bakteri plağından bir öze dolusu koloni alınarak, 500 µl steril saf su içerisinde çözüldü ve kısa süreli vortekslenerek beş dakika 14000 rpm’de santrifüjlendi. Dipteki pelete dokunmadan üstteki sıvı faz tamamen çekildi. Peletin üzerine 200 µl steril saf su ilave edilerek çözüldü. Elde edilen bakteri süspansiyonu kuru ısıtıcı bloğunda (Eppendorf, ThermoStat Plus, Almanya) 95°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda mikrosantrifüj tüpleri buz üzerine alınıp 1 dakika inkübe edildikten sonra, 1 dakika 14000 rpm’de santrifüjlendi. DNA içeren üst sıvı steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp etiketlendi. Elde edilen DNA, kullanılana kadar -80°C’de saklandı.

Referans suşların DNA’ları da yukarıda belirtilen şekilde, ancak kontaminasyonu önlemek amacı ile farklı bir zamanda izole edildi.

### **3.7.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Multipleks PZR, Poirel ve ark.<sup>100</sup>,’nın çalışmasından alınarak optimize edildi ve iki farklı reaksiyon olarak ayrı PZR tüplerinde gerçekleştirildi. Birinci tüpte IMP ve VIM, ikinci tüpte ise OXA-48, NDM ve KPC genlerinin varlığı araştırıldı. Her bir reaksiyon için hazırlanan karışımlar 12.Çizelge ve 13.Çizelge’de gösterildiği gibidir.

12.Çizelge. Multipleks PZR Panel I (IMP-VIM) karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları.

<b>Reaktifler</b>	<b>Stok konsantrasyon</b>	<b>Bir örnek için</b>	<b>Çalışma konsantrasyonu</b>
<b>Hot Start Tampon (10X)</b>	10 X	2.5 µl	1X
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	25 mM	4 µl	4mM
<b>dNTP karışımı</b>	25 mM	0.25 µl	200µM
<b>Hot Start Taq DNA Polimeraz</b>	5U/µl	0.25 µl	2.5 U
<b>Primer (2 çift)</b>	10 pmol	2 µl (herbirinden 0.5 µl)	0.2 µM (0.2 pml/µl)
<b>Steril Saf Su</b>	-	14 µl	-
<b>Kalıp DNA</b>	-	2 µl	-
<b>Toplam</b>		25 µl	



13.Çizelge. Multipleks PZR Panel II (KPC, NDM, OXA-48) karışımındaki kimyasalların konsantrasyonları.

Reaktif	Stok konsantrasyon	Bir örnek için	Çalışma konsantrasyonu
Hot Start Tampon (10X)	10 X	2.5 µl	1X
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	3 µl	3mM
dNTP karışımı	25 mM	0.25 µl	200µM
Hot Start Taq DNA Polimeraz	5U/µl	0.25 µl	2.5 U
Primer (3 çift)	10 pmol	3 µl (herbirinden 0.5 µl)	0.2 µM (0.2 pml/µl)
Steril Saf Su	-	14 µl	-
Kalıp DNA	-	2 µl	-
Toplam		25 µl	

Her bir reaksiyon için (multipleks PZR panel I ve II ) 25 örneklilik PZR karışımı hazırlandı. Bunun için 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüpü içerisine 350 µl steril distile su, 62.5 µl 10 X buffer, 100 µl MgCl<sub>2</sub>, 6.25 µl dNTP mix, 12.5 µl primer (her birinden ), 6.25 µl Taq pol. enzimi eklenerek karıştırıldı. Steril 200 µl'lik mikrosantrifüj tüpleri etiketlenerek içerilerine PZR karışımından 23 µl ilave edilip, 2 µl kalıp DNA ilave edildi. Multipleks PZR panel II için MgCl<sub>2</sub> konsantrasyonunun daha düşük olması nedeni ile multipleks I'den farklı olarak 75 µl MgCl<sub>2</sub> kullanıldı.

Her reaksiyonda, tüm genler için pozitif ve negatif kontrol kullanıldı.

Reaksiyon döngüleri 14.Çizelge'de belirtildiği şartlarda iCycler (BioRad, ABD) marka thermal cycler'da gerçekleştirildi.<sup>100</sup>

14.Çizelge. Multipleks PZR panel I ve II için döngü şartları.

	Multipleks PZR Panel I	Multipleks PZR Panel II		
Aktivasyon	94 °C	94 °C	5 dk	
Denatürasyon	94 °C	94 °C	30 sn	} 30 döngü
Primer bağlanması	52 °C	51 °C	40 sn	
Uzama	72 °C	72 °C	50 sn	
Son uzama	72 °C	72 °C	5 dk	
Sınırsız bekleme	4 °C	4 °C	∞	

### 3.7.4. Elektroforez ve görüntüleme

PZR ürünlerinin gözlemlenmesi için yatay jel elektroforezi kullanıldı. Elektroforez için Tris – Borik asit – EDTA (TBE) tamponu içerisinde %2'lik agaroz jel hazırlandı. Temiz bir erlen içerisinde 25 ml 0.5X TBE tamponu içerisine 0,6 g agaroz (AppliChem, Almanya) koyulup total hacim 0.5X TBE tampon ile 30 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. Jel sıcaklığı yaklaşık 50–55°C'ye düştüğünde, içerisine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik stok Etidyum Bromür solüsyonu ilave edildi. Taraklar elektroforez yatağına yerleştirildikten sonra agaroz içersine döküldü ve yaklaşık 30 dakika katılaşmaya bırakıldı.

Agar katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak, jel yatak ile birlikte tanka (Thermo Scientific, ABD) yerleştirildi. Jelin üzeri kapanacak şekilde 0.5X TBE tamponu ilave edildi. İlk kuyucuğa GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) diğer kuyucuklara ise örneklere, pozitif ve negatif kontrollere ait PZR ürünleri 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılarak (2 µl boyaya 5 µl ürün) yüklendi. Elektroforez 110 V'da 50 dakika yürütülen örnekler GeneLine ImageSCI (Spectronics Corp., ABD) jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek değerlendirildi.

### 3.8. İzolatlar arasındaki klonal ilişkinin PFGE yöntemi ile araştırılması

Karbapenem dirençli HK enfeksiyon etkeni olarak belirlenen 84 *K. pneumoniae* izolatı arasındaki klonal ilişki, izolatların *XbaI* DNA restriksiyon enzimi ile kesimi sonrası PFGE

yöntemi ile araştırıldı. PFGE yöntemi PulseNet tarafından önerilen protokole göre uygulandı.<sup>102</sup>

### **3.8.1. Bakteri kalıplarının hazırlanması**

EMB agarda saf koloni olarak elde edilen suşlar, MHA besiyerine tek koloni ekimi ile pasajlanıp 36°C'de 18 saat inkübe edildi. TE tamponu (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) içerisinde PFGE onaylı agaroz (Bio-Rad, ABD) %1'lik konsantrasyonda hazırlanıp eritildi ve kullanılabildiği kadar 55°C'lik su banyosunda bekletildi. 100 µl'lik hazır kalıplar etiketlenip alt kısmı bantlandıktan sonra buz aküsü üzerine yerleştirildi. İnkübasyon sonrası elde edilen saf kültürlerden steril pamuklu çubuk yardımıyla alınan bakteri kolonileri hücre süspansiyon solüsyonu (100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0 ) içerisinde süspansiyon edildi. Bakteri yoğunluğu spektrofotometre (SHIMADZU UV-1601) ile 610 nm'de optik dansitesi 1.0 olacak şekilde ayarlandı. Steril 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpleri etiketlenerek hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 100'er µl dağıtıldı. Her bir tüpe 100 mg/ml proteinaz-K (Sigma, ABD) solüsyonundan bir µl eklenip otomatik pipet ile karıştırıldı. Üzerlerine %1'lik PFGE agarozdan 100'er µl ilave edilerek yavaşça karıştırıldı. Karışımdan 100 µl alınarak buz aküsü üzerindeki kalıplara hava kabarcığı kalmayacak şekilde dağıtıldı. Bu şekilde hazırlanan bakteri kalıpları +4°C'de 10 dakika katılaştırmaya bırakıldı.

### **3.8.2. Bakteri hücrelerinin parçalanması ve DNA izolasyonu**

Katılaştıran bakteri kalıpları, 5 ml lizis tamponu (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0, %1 Sarcosyl, 0,1 mg/ml proteinaz K) bulunan 15 ml'lik steril falkon tüplere ayrı ayrı aktarılıp, çalkalamalı inkübatörde 55°C'de 2 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonrasında lizis tamponu tamamen uzaklaştırıldı. Agaroz kalıpları 50°C'ye ısıtılmış 10 ml steril distile su ile iki defa, sonrasında 10 ml TE tamponu (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) ile üç defa çalkalamalı inkübatörde 50°C'de 15'er dakika yıkandı. Kesim yapılmak üzere 5 ml TE tamponu içerisinde +4°C'de bekletildi

### **3.8.3. Agaroz kalıpları içerisindeki DNA'nın *XbaI* restriksiyon enzimi ile kesilmesi**

Agaroz kalıplarından steril bistüri ile 2 mm'lik parçalar kesilip, kalıpların kalan kısmı gerektiğinde kullanılmak üzere TE tamponu içerisinde +4°C'de saklandı. Kesim enzimi ile birlikte temin edilen 10X Tango buffer, steril çift distile suyla 1:10 dilüe edilerek kesim

tamponu olarak kullanıldı. Kesilen 2 mm'lik agaroz kalıplar 200 µl 1X Tango buffer içinde oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 1X Tango buffer uzaklaştırılıp, 30 U *XbaI* enzimi (Thermo 10 U/µl) içeren 200 µl kesim tamponu ilave edilerek çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 3 saat inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda tüpler içerisindeki kesim tamponu tamamen uzaklaştırılıp 200 µl 0.5X TBE eklendi ve oda ısısında 5 dakika bekletildi.

#### **3.8.4. Elektroforez ve görüntüleme**

PFGE için için %1'lik jel hazırlandı. PFGE onaylı agarozdan (Bio-Rad, ABD) 1 g tartılıp 100 ml 0.5 X TBE ile karıştırıldı ve mikrodalga fırın içinde tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. Yükleme sonrası, jel içeren kuyucuklara konulmak üzere 5 ml agaroz ayrıldı. Elektroforez yatağına 15 dişli tarak takılıp, yaklaşık 50-55°C'ye soğutulan jel, baloncuk oluşturmadan yatağa döküldü. Su terazisi ile düz olduğundan emin olunan zemin üzerinde 30 dakika katılaşmaya bırakıldı.

Elektroforez tankı 2 L 0.5X steril TBE tamponu ile doldurularak 14°C'ye soğutuldu. Soğutma pompası borularında hava kabarcığı olup olmadığına bakılıp devir daimin olduğuna emin olundu.

Katılaştıran jelden tarak çıkartılıp, *XbaI* enzimi ile kesilmiş bakteri kalıpları steril öze yardımı ile kuyucuklara yerleştirildi. Bakteri kalıplarının yerinden çıkmaması için daha önceden ayrılmış %1'lik agaroz ile kuyucukların üzeri dolduruldu. Moleküler büyüklük standardı olarak ilk ve son kuyucuklara *S. aureus* "NCTC" 8523'ten hazırlanıp, *SmaI* enzimi ile kesilen bakteri kalıpları yüklendi.

Bakteri kalıplarını içeren jel, altındaki tablayla birlikte daha önceden 14°C'ye soğutulmuş 0.5 X TBE içeren elektroforez tankına yerleştirildi.

CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad, ABD) uygulanan elektroforez koşulları başlangıç vuruş süresi 2,2 sn, bitiş vuruş süresi 63,8 sn, akım 6V/cm, sıcaklık 14°C, süre 18 saat olacak şekilde ayarlandı. Elektroforez bitiminde jeller 1 µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml steril distile su içerisinde 30 dakika boyandı. Boyama işlemi sonrasında fazla etidyum bromürün uzaklaştırılması amacıyla jeller 400 ml steril distile su içerisinde, 20 dakikada bir su değiştirilerek 1 saat bekletildi. Fazla boyası uzaklaştırılan jeller, GeneLine ImageSCI

(Spectronics Corp., ABD) jel görüntüleme sisteminde ultraviyole ışığı altında görüntülendi. Fotoğraflar tiff formatında kayıt edildi.

### **3.8.5. Sonuçların değerlendirilmesi**

Bant profilleri, Phoretix 1D Pro (TotalLab Ltd) programı kullanılarak analiz edildi. Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA) metodu ve Dice benzerlik katsayısı kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramı oluşturuldu ve kümelendirme analizi yapıldı.

### **3.9. İstatistiksel analiz**

İstatistiksel değerlendirme, IBM SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı ile yapıldı. Nümerik değişkenler medyan (25. - 75. persentil) ve frekans (yüzdeler) olarak verildi. Gruplar arasındaki farklılık normal dağılıma sahip olmayan nümerik değişkenler için Mann Whitney U Testi ile kategorik değişkenler için Fisher's Exact Kikare analizi, Yates' Kikare analizi ve Monte Carlo Kikare analizi ile değerlendirildi.  $p < 0.05$  istatistiksel olarak önemlilik için yeterli kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolatların genel özellikleri

Çalışmaya her biri ayrı hasta örneğinden izole edilen 100 *K.pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Suşların 51'i erkek, 49'u kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların en küçüğü 1.5 aylık, en büyüğü ise 83 yaşındaydı (ort. yaş: 61.5).

İzolatların 82 tanesi yatan hastalardan, 18 tanesi ise poliklinik hastalarından gönderilen örneklerden izole edilmiştir. Yatan hastaların 19'u YBÜ'nde; 63'ü ise YBÜ dışı birimlerde bulunmaktaydı.

Hastalara ait veriler değerlendirildiğinde, 16 hastanın enfeksiyonu toplum kökenli (11 poliklinik hastası, 5 yatan hasta); 84 hastanın enfeksiyonu hastane kökenli enfeksiyon olarak kabul edilmiştir. Hastane enfeksiyonu etkeni olarak saptanan suşların 7'si (%8) polikliniklerden, 77'si (%92) yatan hastalardan izole edilmiştir.

Örneklerin geldiği kliniklere göre dağılımı 44 dahili servisler, 4 pediatri servis, 8 dahili poliklinikler, 15 cerrahi servisler, 3 cerrahi poliklinikler, 3 cerrahi YBÜ, 13 dahili YBÜ, 4 pediatri YBÜ, 4 acil servis olarak belirlenmiştir. Örneklerin 45'ini idrar, 30'unu yara, 10'unu trakeal aspirat, 5'ini BAL, 2'sini balgam, 3'ünü kan, 2'sini derin doku, 1'ini apse, 1'ini periton sıvısı ve 1'ini genital akıntı örnekleri oluşturmaktadır (15.Çizelge).

15.Çizelge. Çalışmaya alınan *K. pneumoniae* suşlarının izole edildiği örnek türü ve kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Örnek türü										n (%)
	İdrar	Yara	Trakeal aspirat	BAL	Balgam	Kan	Derin doku	Periton sıvısı	Apse	Genital akıntı	
<b>Dahili servisler</b>	24	11	-	2	1	1	2	1	1	1	44 (%44)
<b>Dahili poliklinikler</b>	7	3	-	-	-	-	-	-	-	-	10 (%10)
<b>Dahili YBÜ</b>	-	1	9	2	-	1	-	-	-	-	13 (%13)
<b>Cerrahi servisler</b>	4	9	-	1	1	-	-	-	-	-	15 (%15)
<b>Cerrahi poliklinikler</b>	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (%3)
<b>Cerrahi YBÜ</b>	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (%3)
<b>Pediyatri servisi</b>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (%4)
<b>Pediyatri YBÜ</b>	1	1	1	-	-	1	-	-	-	-	4 (%4)
<b>Acil</b>	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4 (%4)
<b>Toplam</b>	45	30	10	5	2	3	2	1	1	1	100 (%100)

n: Örnek sayısı, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, BAL: Bronko Alveolar Lavaj

Suşların izole edildiği hastalar değerlendirildiğinde, hastalar arasında son bir ayda karbapenem kullanımını %39, sefalosporin kullanımını %29, YBÜ’nde bulunma %53, majör cerrahi işlem geçirme %39, immün süpresyon %27, malignite %40, diyabet %30, hipertansiyon (HT) %43, kronik böbrek yetmezliği (KBY) %24, serebrovasküler hastalık (SVH) %24, mekanik ventilatör (MV) %19, santral venöz kateter (SVK) %11, trakeotomi

%11, üriner kateter %30, kardiyovasküler hastalık (KVH) %29 ve pulmoner hastalık varlığı %14 olarak saptanmıştır.

Ampirik olarak en sık başlanan antibiyotikler sırasıyla, meropenem (32 hasta), piperasilin/tazobaktam (26 hasta) ve seftriakson (21 hasta), amikasin (14 hasta) olarak belirlenmiştir. 100 hastanın 32'sinde tedavi ile kür sağlanmış, üçü antibiyotik başlanamadan vefat etmiştir. Hastaların altısında kür sonrası tekrarlayan enfeksiyon saptanmış, dokuzunda tedaviye rağmen kültür pozitifliği devam etmiş, kültür pozitifliği bildirilen üç hasta kolonize kabul edilmiştir. Hastaların 13'ünden kontrol kültür alınmamıştır. 11 hasta dış merkez YBÜ'ne sevk edildiğinden, 23 hastanın ise hastane bilgi sisteminde kayıtlı verisi bulunmadığından tedavileri hakkında veri elde edilememiştir. PDR *K.pneumoniae* izole edilmiş beş yoğun bakım hastası kültür sonuçları çıkmadan başka bir merkeze sevk edildiğinden tedavileri hakkında veri elde edilememiştir. Diğer dört hastanın tedavilerinde MEM+ETP, ETP+PIPTAZ, AM+MEM+TG, SXT+CN ve kullanılarak sırasıyla ile 10., 8., 7., ve 10. günlerde kür sağlanmıştır. Ancak bir hastada MEM+TG ile 17 güne, diğerinde MEM 40 gün +COL 20 gün + TG ile 14 gün tedaviye rağmen kültür pozitifliği devam etmiştir.

#### **4.2. Antimikrobiyal duyarlılık**

Test edilen tüm izolatlar için %100 dirençli saptanan antimikrobiyal ajanlar; ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit ve piperasilin-tazobaktam olarak belirlenmiştir. İzolatların en duyarlı olduğu antimikrobiyal ajanlar ise kolistin (%42) ve amikasin (%39) olarak saptanmıştır. Vitek-2 sistemi ile karbapenemlerden herhangi birine azalmış duyarlılığı saptanan suşların alındığı çalışmamızda karbapenem grubu antimikrobiyal ajanlar için agar dilüsyon yöntemi ile saptanan direnç oranları; ertapenem için %98, imipenem için %56 ve meropenem için %70 olarak bulunmuştur. Tigesiklin, seftazidim, sefotaksim, siprofloksasin, gentamisin ve trimetoprim-sülfometaksazol için sırasıyla, %37, %98, %98, %94, %81, %63 oranında direnç saptanmıştır (16.Çizelge).



16.Çizelge. Suşların antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Ortaduyarlı (I)	Dirençli (R)	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK aralığı
AMP	% 0	% 0	% 100	64	>64	32->64
AMC	% 0	% 0	% 100	-	-	-
TZP	% 0	% 0	% 100	-	-	-
CAZ	% 1	% 1	% 98	>32	>32	0.5->32
CTX	% 1	% 1	% 98	>16	>16	1->16
CİP	% 2	% 4	% 94	8	>8	0.25->8
CN	% 18	% 1	% 81	16	>32	≤0.25->32
ETP	% 0	% 2	% 98	32	64	1-64
MEM	% 11	% 19	% 70	16	32	0.5-64
İPM	% 16	% 28	% 56	16	32	0.5-64
KOL	% 42	% 1	% 57	8	16	0.25->16
AK	% 39	% 23	% 38	16	128	≤1->128
TG	% 21	% 42	% 37	2	8	0.25->16
SXT	% 34	% 3	% 63	-	-	-

#### 4.3. Multipleks PZR ile saptanan karbapenemaz üretiminden sorumlu genler ve sıklığı

Çalışmaya dahil edilen 100 KDKP izolatının 95'inin karbapenemaz direncinden sorumlu olan en az bir gen taşıdığı belirlenmiştir. İzolatların 5'inde ise çalışmada araştırılan karbapenemaz direncinden sorumlu genlerden herhangi biri saptanmamıştır. Saptanan genlerin %81.05'inin *bla<sub>OXA-48</sub>*, %38.9'unun *bla<sub>NDM</sub>* ve %9.47'sinin *bla<sub>KPC</sub>* olduğu belirlenmiştir. Genlerin tek başına görülme sıklığı *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>* ve *bla<sub>KPC</sub>* için sırasıyla %53.6, %9.4 ve %6.3 olarak belirlenmiştir. *bla<sub>OXA-48</sub>* ve *bla<sub>NDM</sub>*'nin birlikte bulunma

sıklığı %26.3, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub>'nin %2.1, *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub>'nin % 1.05, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>VIM</sub>'in %1.05 olarak saptanmıştır. Toplum ve hastane kökenli izolatlarda karbapenem direncinden sorumlu genlerin görülme sıklığı 17.Çizelge'de, PZR-elektroforez sonrası örnek jel görüntüleri ise 2. ve 3.Çizim'lerde gösterildiği gibidir.

YBÜ'lerinden izole edilen 19 suşta en sık görülen karbapenemaz enzimi 10 izolatta (%52.6) saptanan OXA-48 olmuştur. İkinci sıklıkta saptanan OXA-48+NDM enzimi ise 8 izolatta (%42.1) saptanmıştır. Genlerin YBÜ ve YBÜ dışı bölümler arasındaki dağılımı 18.Çizelge'de gösterilmiştir.

VIM+NDM pozitif olarak saptanan tek izolat, çocuk YBÜ'nde yatan 3,5 aylık erkek hastanın yara yeri kültüründen izole edilmiştir. Hastanın son 1 ayda karbapenem, sefalosporin kullanımı ve YBÜ'nde bulunma öyküsü mevcuttur. KVH ve trakeotomisi bulunan hasta mekanik ventilatör'e bağlıydı. İzolat kolistin ve amikasin'e duyarlı, diğer antibiyotiklere dirençli olarak belirlenmiştir.

OXA-48+KPC enzimi ürettiği saptanan tek izolat ise genel cerrahi servisinde yatan 61 yaşında kadın hastanın yara yeri kültüründen izole edilmiştir. Hastanın son 1 ayda karbapenem kullanımı, YBÜ'nde bulunma ve majör cerrahi geçirme öyküsü mevcuttu. Diyabet, HT, KBY, KVH ve üriner kateteri bulunmaktaydı. İzolat test edilen tüm antibiyotiklere dirençli olarak saptanmıştır.

Kolonize kabul edilen ve toplum kökenli olarak değerlendirilen üç izolat, idrar kültürlerinden edilmiş ve OXA+NDM pozitif olarak saptanmıştır.

Yara yeri kültürlerinden izole edilen NDM ve NDM+KPC pozitif saptanan iki suş, idrar örneklerinden izole edilen OXA, KPC, NDM+KPC pozitif saptanan üç suş ve idrar örneğinden izole edilip, araştırılan karbapenemaz enzimlerinden hiçbirini üretmeyen bir suş, dış merkez kaynaklı hastane enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilmiştir.

KPC+NDM pozitif olarak saptanan iki suş ta dış merkez kaynaklı hastane enfeksiyonu etkeni olarak değerlendirilmiştir. Biri, KBB servisinde yatan 55 yaşında kadın hastanın yara yerinden 15.1.17 tarihinde izole edilmiştir. Son 1 ayda sefalosporin kullanımı ve YBÜ'nde bulunma öyküsü olan hastanın, HT, SVH, trakeotomi ve üriner kateteri bulunmaktadır. İzolat sadece TG'ne orta duyarlı diğer antibiyotiklere dirençli olarak bulunmuştur. Hastadan kontrol kültürü alınmamıştır. Diğeri ise gastroenteroloji servisinde yatan 69 yaşında kadın hastanın idrar örneğinden 18.1.17 de izole edilmiştir. Son 1 ayda YBÜ'nde bulunma öyküsü olan hastada, immünsüpreyon, diyabet, HT, KBY, KVH ve

pulmoner hastalık mevcuttur. İzolat KOL, TG ve SXT'e duyarlı diğer antibiyotiklere dirençli olarak saptanmıştır. SXT ile tedavi edilen hasta, 15 günde kür olmuştur.

Toplum kökenli enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen 16 izolatın 11'inde sadece OXA-48 enzimi saptanırken, 5'inde OXA-48 ve NDM enzimi birlikte saptanmıştır.

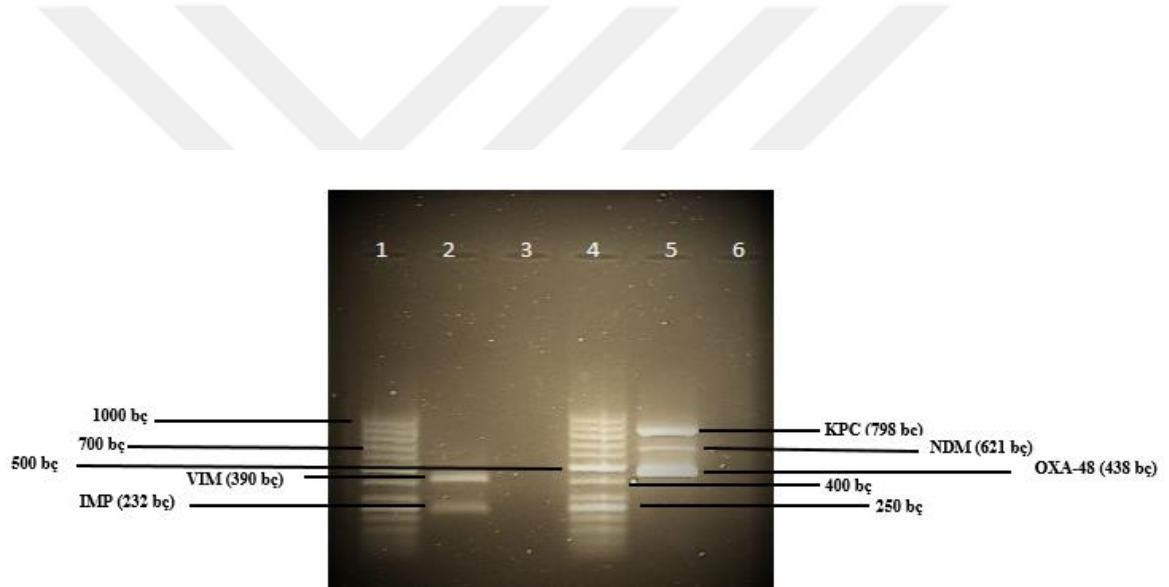
17.Çizelge. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerin görülme sıklığı.

Pozitif saptanan genler	Örnek sayısı n(%)		Toplam n(%)
	HK	TK	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	40(%50.6)	11(%68,8)	51(%53.7)
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	9(%11.4)	0	9(%9.5)
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	6(%7.5)	0	6(%6.3)
<i>bla</i> <sub>OXA-48+NDM</sub>	20(%25,3)	5(%31,4)	25(%26.3)
<i>bla</i> <sub>KPC+NDM</sub>	2(%2,5)	0	2(%2.1)
<i>bla</i> <sub>OXA-48+KPC</sub>	1(%1,2)	0	1(%1.05)
<i>bla</i> <sub>VIM+NDM</sub>	1(%1,2)	0	1(%1.05)
<b>Toplam</b>	<b>79(%83.2)</b>	<b>16(%16.8)</b>	

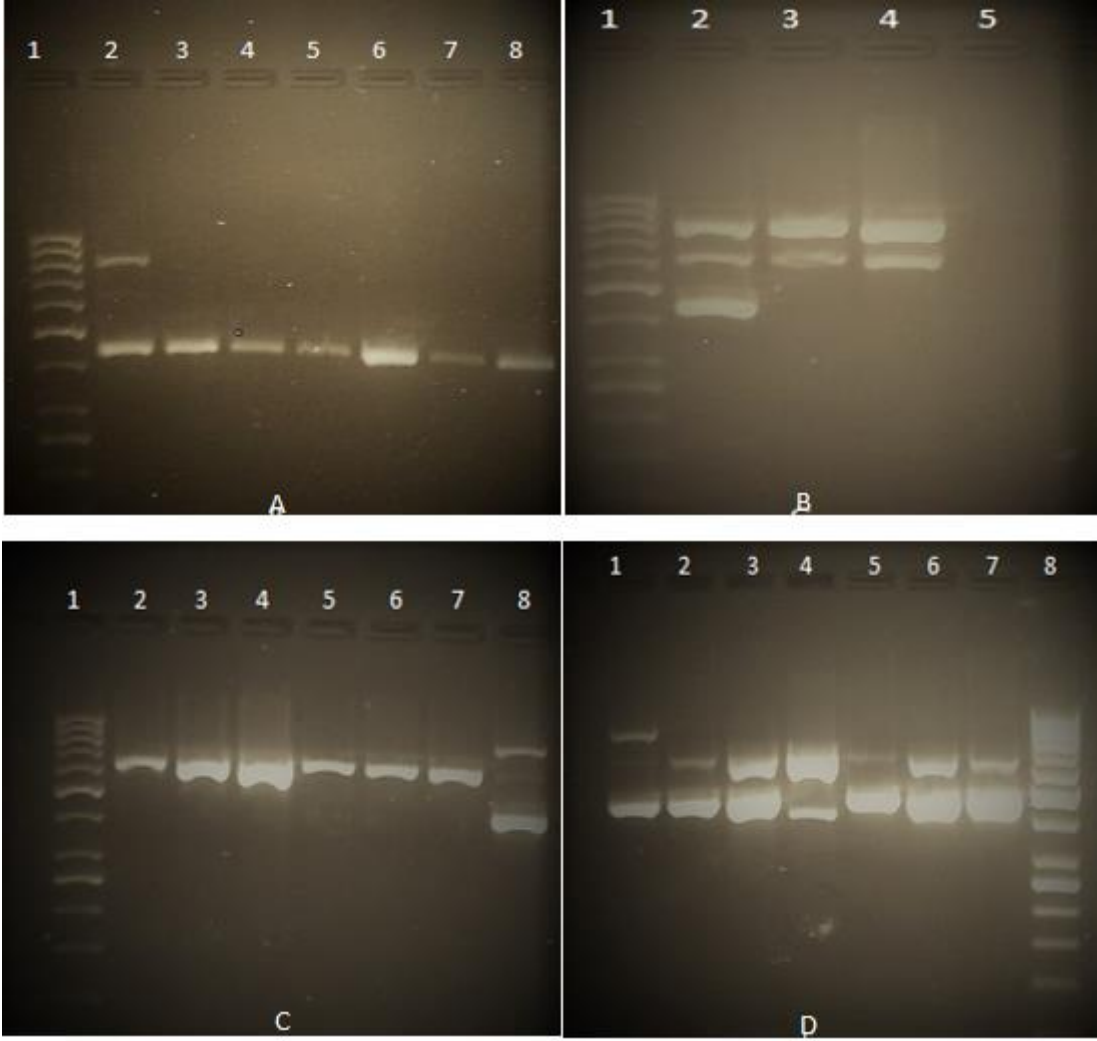
Saptanan genlerin dağılımı açısından HK-TK enfeksiyonları arasında anlamlı fark saptanmamıştır (p>0,05).

18.Çizelge. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerin YBÜ ve YBÜ dışı bölümler arasındaki dağılımı.

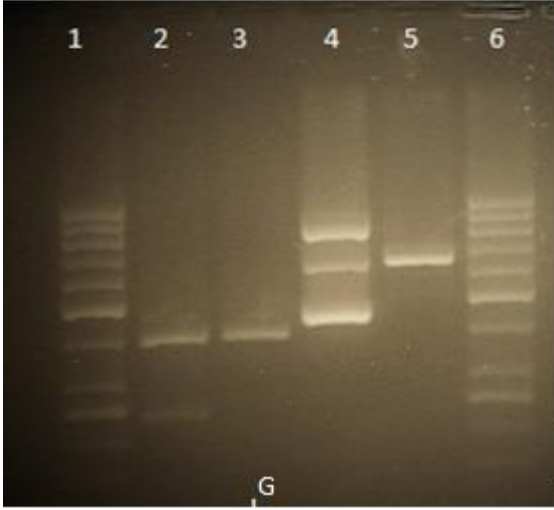
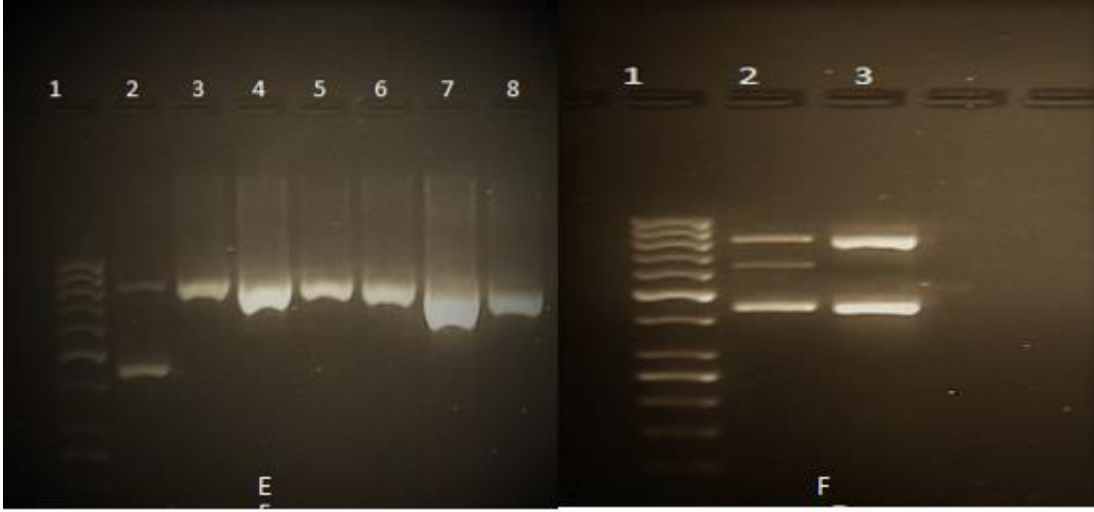
	<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48+NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>OXA-48+KPC</sub>	<i>bla</i> <sub>VIM+NDM</sub>	<i>bla</i> <sub>KPC+NDM</sub>
<b>YBÜ</b>	10 (%52.6)	0 (%0)	0 (%0)	8 (%42.1)	0 (%0)	1 (%5.3)	0 (%0)
<b>YBÜ dışı bölümler</b>	41 (%50.6)	9 (%11.1)	6 (%7.4)	17 (%21)	1 (%1.2)	0 (%0)	2 (%2.5)



2.Çizim. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlere ait pozitif ve negatif kontrol örneklerinin jel görüntüleri. 1, Marker (50 bp); 2, multipleks PZR panel I pozitif kontrol; 3, negatif kontrol; 4, Marker (50 bp); 5, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 6, negatif kontrol



3.Çizim. İzolatlarda saptanan karbapenemaz üretiminden sorumlu genlere ait jel görüntüleri. **A.** Sadece OXA-48 pozitif örneklere ait jel görüntüleri. 1, Marker (50 bp); 2, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 3, 4, 5, 6, 7, 8, hasta örnekleri. **B.** KPC ve NDM pozitif örneklere ait jel görüntüleri. 1, Marker (50 bp); 2, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 3, 4, hasta örnekleri. **C.** Sadece NDM pozitif örneklere ait jel görüntüleri. 1, Marker (50 bp); 2, 3, 4, 5, 6, 7 hasta örnekleri; 8, multipleks PZR panel II pozitif kontrol. **D.** OXA-48 ve NDM pozitif örneklere ait jel görüntüleri. 1, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 2, 3, 4, 5, 6, 7, hasta örnekleri; 8, Marker (50 bp).



3. Çizim devamı. **E.** Sadece KPC pozitif örneklere ait jel görüntüleri. 1, 50 bp Marker; 2, Multipleks PZR Panel II pozitif kontrol; 3, 4, 5, 6, 7, 8, hasta örnekleri.

**F.** KPC ve OXA-48 pozitif örneğe ait jel görüntüsü. 1, 50 bp Marker; 2, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 3, hasta örneği.

**G.** VIM ve NDM pozitif örneğe ait jel görüntüsü. 1, 50 bp Marker; 2, multipleks PZR panel I pozitif kontrol; 3, hasta örneği; 4, multipleks PZR panel II pozitif kontrol; 5, hasta örneği; 6, 50 bp Marker.

#### 4.4. Karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerin varlığında karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının irdelenmesi

Ertapenem duyarlılığı: Sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* geni pozitif saptanan 51 adet izolattan iki tanesi ertapeneme orta duyarlı bulundu. Diğer genlere sahip izolatların hepsi ertapenem dirençli idi. Genler ve ETP duyarlılığı açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p=0,495).

Meropenem duyarlılığı: Saptanan genler, meropenem duyarlılığı açısından karşılaştırıldığında sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitif izolatlarda anlamlı bir fark saptanmıştır (p =0,003). Sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitif olarak saptanan izolatlar diğer genleri içeren izolatlara göre belirgin olarak meropeneme duyarlıydı.

İmipenem duyarlılığı: Saptanan genler, imipenem duyarlılığı açısından karşılaştırıldığında sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitiflerde anlamlı bir fark saptanmıştır (p < 0,001). Sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitif olarak saptanan izolatlar diğer genleri içeren izolatlara göre belirgin olarak imipeneme duyarlıydı.

Saptanan genler ve karbapenemlere olan duyarlılık sonuçları 19.Çizelge’de gösterildiği gibidir.

19.Çizelge. Genler ve karbapenem duyarlılıklarının karşılaştırılması.

	Duyarlı (n)			Orta duyarlı (n)			Dirençli (n)			MİK <sub>50</sub> (µg/ml)			MİK <sub>90</sub> (µg/ml)		
	İPM	MEM	ETP	İPM	MEM	ETP	İPM	MEM	ETP	İPM	MEM	ETP	İPM	MEM	ETP
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	10	8	0	24	15	2	17	28	49	8	16	16	16	16	32
<i>bla<sub>NDM</sub></i>	0	0	0	1	1	0	8	8	9	16	16	32	16	16	32
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	0	0	0	1	1	0	5	5	6	16	16	32	32	32	64
<i>bla<sub>OXA-48</sub>+NDM</i>	0	0	0	3	1	0	22	24	25	16	16	32	64	32	64
<i>bla<sub>OXA-48</sub>+KPC</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>NDM</sub>+VIM</i>	0	0	0	0	0	0	1	1	1	-	-	-	-	-	-
<i>bla<sub>KPC</sub>+NDM</i>	0	0	0	0	0	0	2	2	2	-	-	-	-	-	-

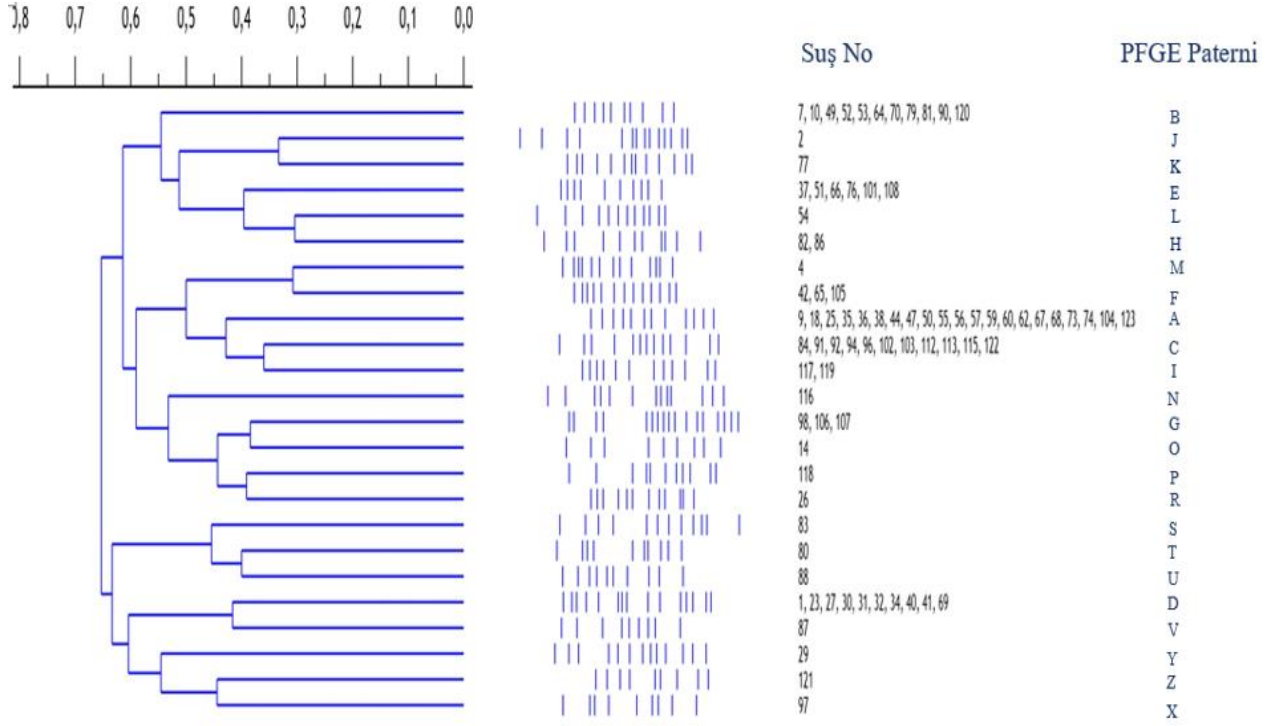
#### 4.5. Örneklerin gönderildiği kliniklere göre karbapenem grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının irdelenmesi

Örneklerin gönderildiği klinikler karbapenem duyarlılığındaki azalma açısından karşılaştırıldığında; YBÜ'nden gelen örneklerden izole edilen suşlarda meropenem ve imipenem duyarlılığının belirgin olarak azalmış olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ertapenem için ise anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ).

#### 4.6. PFGE bulguları

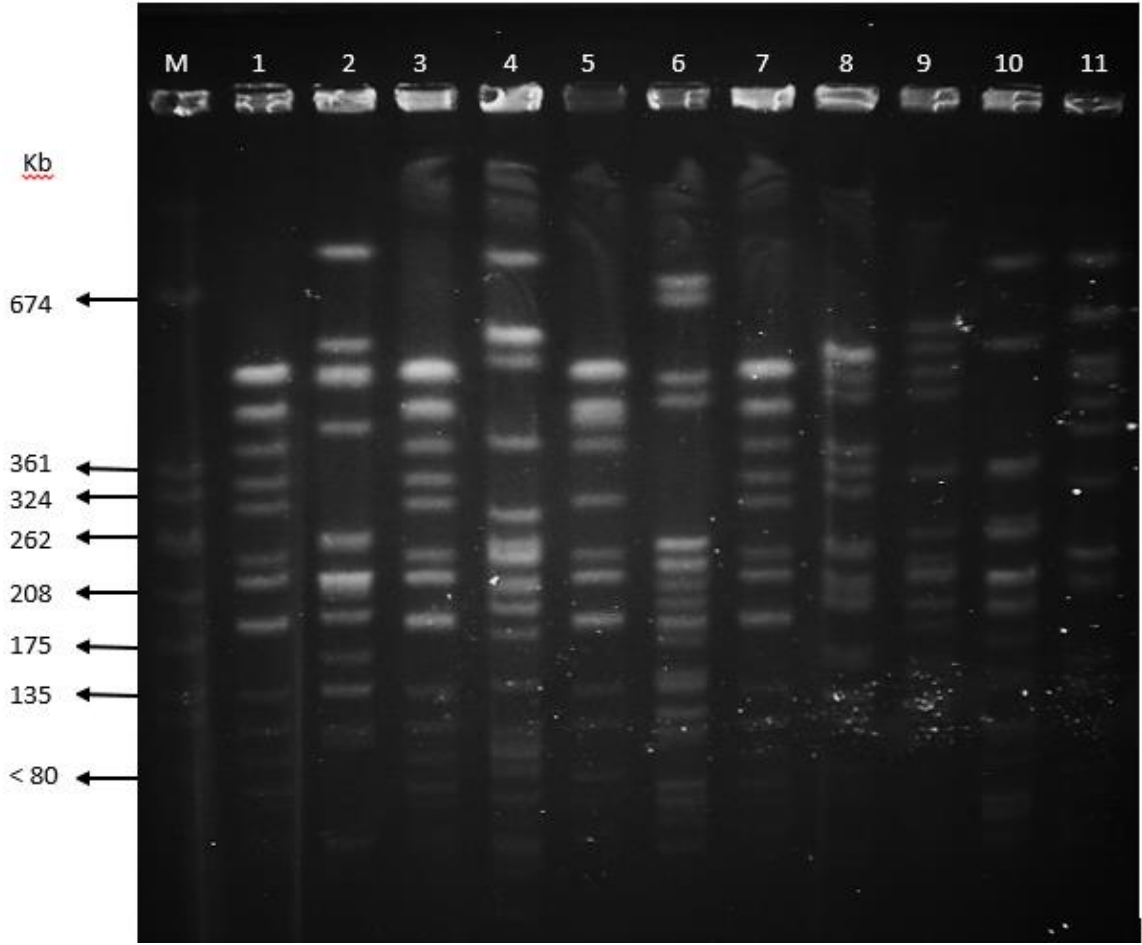
84 izolatın PFGE analizi ile 4 majör patern A (21/84), B (11/84), C (11/84), D (10/84) saptanmıştır. Diğer paternler ise 15'i bağımsız olmak üzere (J-Z, X), E (6/84), F (3/84), G (3/84), H (2/84), I (2/84) olarak belirlenmiştir. Multipleks PZR ile sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* geni tespit edilen 40 izolattan pulsotip A'da 19, pulsotip B'de 8, pulsotip C'de 4, pulsotip D, E, M, P, S, V, Y, Z ve X'de ise 1'er izolat bulunmuştur. *bla<sub>OXA-48+NDM</sub>* geni saptanan 20 izolattan pulsotip A'da 1, pulsotip B'de 2, pulsotip C'de 5, pulsotip D de 8, pulsotip G'de 3 ve pulsotip K'da 1 izolat bulunmuştur. Sadece *bla<sub>NDM</sub>* geni saptanan 9 izolatın 2'si pulsotip C'de, diğer 7'si ise farklı PFGE paternleri sergilemiştir (A, D, H, J, L, O, T). Sadece *bla<sub>KPC</sub>* geni saptanan 6 izolattan pulsotip E'de 4, pulsotip B ve F'de 1'er izolat bulunmuştur. *bla<sub>KPC+NDM</sub>* geni saptanan 2 izolat da pulsotip I'da bulunmuştur. *bla<sub>OXA-48+KPC</sub>* geni ve *bla<sub>VIM+NDM</sub>* geni saptanan birer izolat sırasıyla pulsotip E ve N'de bulunmuştur. Multipleks PZR ile karbapenem direncinden sorumlu herhangi bir gen tespit edilmeyen izolatlardan pulsotip F'de 2, pulsotip H, R ve U'da 1'er izolat bulunmuştur. İzolatların PFGE paternleri ve klonal ilişkilerinin dendrogramı 4.Çizim'de gösterilmiştir.





4.Çizim. İzolatların PFGE analizi ile elde edilen dendrogramı.

Bazı suşların PFGE bant profilleri 5.Çizim'deki gibidir.



5.Çizim. PFGE bant profilleri. M *S.aureus* NCTC 8325; 1, 3, 5, 7 Pulsotip A sırasıyla 73, 59, 50, 56 nolu suşlar; 2 Pulsotip B 83 nolu suş; 4, 10 Pulsotip C sırasıyla 113 ve 94 nolu suşlar; 6 Pulsotip G 107 nolu suş; 8 Pulsotip R 26 nolu suş; 9 Pulsotip E 37 nolu suş; 11 Pulsotip 88 nolu suş.

PFGE yapılan 84 izolatın PFGE tipleri, suşların izole edildikleri örnek türü, klinikler ve izolasyon tarihleri 20.Çizelge'de gösterilmiştir. Aynı pulsotip içerisindeki aynı kliniklerden çok yakın tarihli izole edilmiş ve bir salgın patlak vermiş olup ilgili izolatlar **koyu renk** ile belirtilmiştir.

20.Çizelge. PFGE yapılan 84 suşun PFGE paternleri, suşların izole edildikleri örnek türü, klinikler ve izolasyon tarihleri.

PFGE Paterni	İzolat No	Multipleks PZR	Klinik	İzolasyon Tarihi	Örnek Türü
A	9	OXA-48+NDM	G. cerr. serv.	12.1.2015	Yara
	18	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	18.2.2015	Yara
	25	OXA-48	Cerr. YBÜ	18.3.2015	Yara
	35	OXA-48	Plastik cerr. Serv.	8.4.2015	Yara
	36	OXA-48	Dah. Serv.	14.4.2015	İdrar
	38	OXA-48	Plastik cerr. Serv.	20.4.2015	Yara
	44	OXA-48	Dah. Serv.	18.5.2015	İdrar
	47	OXA-48	G. cerrahi serv.	27.5.2015	Yara
	50	OXA-48	Cerr. YBÜ	13.6.2015	İdrar
	55	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>26.6.2015</b>	<b>TA</b>
	56	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>27.6.2015</b>	<b>TA</b>
	57	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>27.6.2015</b>	<b>TA</b>
	59	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>5.7.2015</b>	<b>TA</b>
	60	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>3.7.2015</b>	<b>Kan</b>
	62	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>6.7.2015</b>	<b>TA</b>
	67	OXA-48	Üro. Serv.	9.8.2015	Balgam
	68	<b>OXA-48</b>	<b>Hemato-Onko. Serv.</b>	<b>6.8.2015</b>	<b>BAL</b>
	73	<b>OXA-48</b>	<b>Hemato-Onko. Serv.</b>	<b>17.8.2015</b>	<b>Yara</b>
	74	<b>OXA-48</b>	<b>Hemato-Onko. Serv.</b>	<b>16.8.2015</b>	<b>İdrar</b>
	104	OXA-48	Nöro. Serv.	3.10.2016	İdrar

	123	NDM	Ortop. Serv.	18.7.2016	İdrar
B	7	OXA-48+NDM	Hemato-Onko. Serv.	14.1.2015	Genital akıntı
	10	OXA-48	Dah. Serv.	12.2.2015	Yara
	49	OXA-48	Dah. Serv.	6.6.2015	Derin doku
	52	OXA-48	Dah. YBÜ	11.6.2015	Yara
	53	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	15.6.2015	Yara
	64	OXA-48	G. cerr. serv.	18.7.2015	Yara
	70	OXA-48	FTR serv.	11.8.2015	Yara
	79	OXA-48	Kardiyo serv.	31.8.2015	İdrar
	81	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	7.9.2015	Yara
	90	OXA-48+NDM	Plastik cerr. Serv.	6.1.2016	Yara
	120	KPC	Enf. Polk.	30.1.2017	Yara
C	84	NDM	Derma. Serv.	17.10.2015	İdrar
	91	OXA-48	Dah. Serv.	17.6.2016	İdrar
	92	OXA-48+NDM	Dah. YBÜ	17.6.2016	BAL
	94	NDM	Plastik. Polk.	18.7.2016	Yara
	96	OXA-48+NDM	Cerr. YBÜ	17.7.2016	Yara
	<b>102</b>	<b>OXA-48+NDM</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>3.10.2016</b>	<b>TA</b>
	<b>103</b>	<b>OXA-48+NDM</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>2.10.2016</b>	<b>TA</b>
	<b>112</b>	<b>OXA-48</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>26.10.2016</b>	<b>TA</b>
	113	OXA-48	Enf. Serv.	6.10.2016	Yara
	<b>115</b>	<b>OXA-48+NDM</b>	<b>Dah. YBÜ</b>	<b>8.12.2016</b>	<b>TA</b>

	122	OXA-48	Enf. Serv.	2.2.2017	İdrar
D	1	NDM	Dah. Serv.	14.1.2015	İdrar
	23	OXA-48+NDM	Acil	15.3.2015	İdrar
	27	OXA-48+NDM	Enf. Polk.	16.3.2015	Yara
	30	OXA-48+NDM	Nöro. Serv.	25.3.2015	İdrar
	31	OXA-48+NDM	Dah. Serv.	24.3.2015	İdrar
	32	OXA-48+NDM	G. cerrahi serv.	1.4.2015	Yara
	34	OXA-48+NDM	Hemato-Onko. Serv.	6.4.2015	İdrar
	40	OXA-48+NDM	Plastik cerr. Serv.	24.4.2015	Yara
	41	OXA-48+NDM	FTR serv.	7.5.2015	İdrar
	69	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	5.8.2015	İdrar
E	37	KPC	Dah. Serv.	20.4.2015	Yara
	51	KPC	Dah. Serv.	10.6.2015	Periton sıvısı
	66	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	4.8.2015	Apse
	76	KPC	Acil	19.8.2015	İdrar
	101	OXA-48+KPC	G. cerr. serv.	28.8.2016	Yara
	108	KPC	Enf. Polk.	30.11.2016	Yara
F	42	KPC	Göğüs. Serv.	12.5.2015	Yara
	65	NEGATİF	G.cerr. polk.	30.7.2015	Yara
	105	NEGATİF	Dah. Serv.	11.10.2016	Kan
G	98	OXA-48+NDM	Ped. YBÜ	1.8.2016	TA
	106	OXA-48+NDM	Ped. YBÜ	10.11.2016	İdrar

	<b>107</b>	<b>OXA-48+NDM</b>	<b>Ped. YBÜ</b>	<b>16.11.2016</b>	<b>Kan</b>
H	82	NDM	Dah. Serv.	2.10.2015	İdrar
	86	NEGATİF	Enf. Serv.	10.11.2015	İdrar
I	117	KPC+NDM	KBB serv.	15.1.2017	Yara
	119	KPC+NDM	Dah. Serv.	18.1.2017	İdrar
J	2	NDM	Ped. Serv.	30.1.2015	İdrar
K	77	OXA-48+NDM	Dah. Serv.	26.8.2015	Balgam
L	54	NDM	Dah. Serv.	20.6.2015	İdrar
M	4	OXA-48	Ortop. Serv.	30.1.2015	BAL
N	116	NDM+VIM	Ped. YBÜ	12.12.2016	Yara
O	14	NDM	Derma. Serv.	12.2.2015	Derin doku
P	118	OXA-48	Dah. YBÜ	13.1.2017	BAL
R	26	NEGATİF	FTR serv.	18.3.2015	Yara
S	83	OXA-48	FTR serv.	5.10.2015	İdrar
T	80	NDM	KVC polk.	7.9.2015	Yara
U	88	NEGATİF	Ped. Serv.	24.11.2015	İdrar
V	87	OXA-48	Nöro. Serv.	20.11.2015	İdrar
Y	29	OXA-48	Dah. Serv.	18.3.2015	İdrar
Z	121	OXA-48	Göğüs. Serv.	1.2.2017	BAL
X	97	OXA-48	Hemato-Onko. Serv.	24.7.2016	İdrar

G. cerr. serv.: Genel cerrahi servisi, Hemato-Onko.: Hematoloji- Onkoloji, YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi, Dah.: Dahiliye, Üro: Üroloji, Nöro.: Nöroloji, Ortop.: Ortopedi, Kardiyo: Kardiyoloji, FTR: Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon, Enf. Polk.: Enfeksiyon poliklinik, Derma.: Dermatoloji, Göğüs.: Göğüs hastalıkları, Ped.: Pediatri, KBB: Kulak Burun Boğaz, KVC: Kardiyovasküler Cerrahi

Pulsotip A’da bulunan izolatların antibiyotik duyarlılıkları birbirleri ile benzer olup, sadece üç izolat farklı bir şekilde KOL’ne duyarlı olarak bulunmuştur.

Pulsotip B’de bulunan izolatların antibiyotik duyarlılıkları da birbirleri ile benzer olup, farklı olarak bir izolat KOL’ne, iki izolat TG’ne duyarlı olarak bulunmuştur.

Pulsotip A ve B’dekiler için en duyarlı antibiyotik SXT olarak saptanmıştır.

Pulsotip C’de bulunan izolatların antibiyotik duyarlılıkları birbirleri ile benzer olup, sadece iki izolat farklı bir şekilde KOL’ne duyarlı olarak bulunmuştur.

Pulsotip D’deki OXA-48+NDM enzimi pozitif olan izolatların hepsi KOL dışında aynı duyarlılık paternini sergilemiştir.

PFGE yapılan 84 *K. pneumoniae* izolatının agar dilüsyon ile elde edilen antibiyotik duyarlılıkları PFGE tiplerine göre gruplandırılarak 21.Çizelge’de gösterilmiştir.

21.Çizelge. PFGE ile farklı paternlerde saptanan suşların antibiyotik duyarlılıkları.

	PFGE PATERNİ (n)																								
AB	A (21)	B (11)	C (11)	D (10)	E (6)	F (3)	G (3)	H (2)	I (2)	J (1)	K (1)	L (1)	M (1)	N (1)	O (1)	P (1)	R (1)	S (1)	T (1)	U (1)	V (1)	Y (1)	Z (1)	X (1)	
ETP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R
MEM	R	R	R	R	S/I/4R	2S/R	R	I/R	R	R	R	I	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	R	R	
İPM	S/11I/9R	S/6I/4R	R	R	S/I/4R	2S/R	R	S/R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	S	S	S	S	R	I
KOL	3S/18R	S/10R	3S/8R	5S/5R	S/5R	2S/R	S	S	S/R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	
AMP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
AMC	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
CAZ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	
CTX	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	
TZP	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	
AK	9S/9I/3R	4S/6I/R	3S/8R	S/9R	S/4I/R	S	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	I	I	
CIP	R	R	R	R	R	R	I/2R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	R	R	R	
TG	S/14I/6R	2S/7I/2R	2S/2I/7R	S/2I/7R	R	2I/R	S/I/R	S	I/S	R	I	R	R	I	S	S	I	S	I	I	S	S	S	I	
CN	S/20R	R	R	R	3S/3R	S	S/2R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	S	
SXT	14S/I/6R	6S/5R	R	R	R	R	S/2R	R	S/R	R	S	R	I	S	R	S	S	S	R	R	R	R	S	R	

AB: Antibiyotik, n: İzolat sayısı



## 5. TARTIŞMA

Enterik bakteriler arasında karbapenem direncinin en yaygın gözleendiği tür *K.pneumoniae* 'dır.<sup>41,53</sup> UAMDSS-“CAESAR” verilerine göre, ülkemiz invaziv *K.pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnç yüzdeleri 2013, 2014, 2015 yıllarında sırasıyla %11, %28, %30 olarak bildirilmiştir.<sup>5,103</sup> Avrupa'daki karbapenem direnç ortalaması 2015 yılında %8,1 olarak saptanmıştır.<sup>104</sup> Karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatları dünya genelinde artan sıklıkta izole edilmeleri ile önemli bir acil durum haline gelmiştir. Hatta KPC, ABD, Yunanistan ve İsrail'de, VIM Yunanistan'da, NDM Hindistan ve Balkan ülkelerinde, OXA-48 ise ülkemizde ve Kuzey Afrika'da endemik olarak görülmektedir. Genellikle çoklu direnç genlerine de sahip olduklarından sebep oldukları enfeksiyonlar yüksek mortalite hızları ile ilişkilidir.<sup>33, 39, 51</sup>

Karbapenem direncinin saptanmasında meropenem duyarlılık ve özgüllük dengesi açısından en iyi ajan olarak bildirilmiştir. Ertapenem duyarlılık açısından mükemmel olmakla birlikte porin kaybı ve GSBL veya AmpC beta laktamazların varlığında, düşük stabilitesi nedeniyle özgüllüğü düşüktür.<sup>33, 39</sup> Bizim çalışmamızda multipleks PZR ile direnç geni saptanan 95 izolatta agar dilüsyon yöntemi ile ertapeneme duyarlı suş saptanmamıştır. İzolatların yedisi (%7.3) meropeneme, 11 (%11.57)'i imipeneme duyarlı bulunmuştur. Meropenem ve imipenemin duyarlılık - özgüllükleri sırasıyla %92.6 - %88.4 ve %60 - %100 olarak bulunmuştur. Karbapenemaz genine sahip suşların hepsinin ETP dirençli olması nedeniyle, karbapenemaz taramasında en duyarlı karbapenem ETP olarak saptanmıştır. ETP'nin özgüllüğünün düşük oranlarda olmasına rağmen, karbapenemaz üreten suşları atlamaması nedeniyle (duyarlılık %100) karbapenemazların fenotipik olarak saptanmasında, tarama amacıyla ETP kullanımı önerilmektedir<sup>51, 105</sup>

Çalışmamızdaki 100 izolatın diğer antibiyotik duyarlılık durumları değerlendirildiğinde, hepsi AMP, TZP ve AMC'a, %98'i CAZ ve CTX'ne, %94'ü CİP'ne, %81'i CN'ne, %63'ü SXT'e, %37'si TG'ne, %38'i AK'ne ve %57'si KOL'ne dirençli bulunmuştur. *K.pneumoniae*'da karbapenemlere direnç, genellikle aminoglikozid, GSBL, kinolon direnciyle beraber görülmektedir.<sup>8, 12</sup> Bu çalışmada da karbapenemaz üreten ve karbapenem dirençli izolatların büyük kısmının bu grup antibiyotiklere de dirençli olduğu gözlenmiştir. Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden CN'e %81 oranında direnç gözlenirken AK'ne direnç oranının daha düşük (%38) bulunmuş olmasının bu ilacın

hastanemizdeki tedavi protokollerinde sıklıkla tercih edilmemesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. KÜE üyeleri, çoğu bata laktam antibiyotikleri hidrolize edebilmesi ve bu izolatların sıklıkla fluorokinolon, aminoglikozid gibi diğer antibiyotik sınıflarına karşı da direnç mekanizmalarını bir arada bulundurması nedeniyle bu suşlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde çok az terapötik ajan kullanılabilir. Buna ek olarak, TG ve polimiksinler gibi son seçenek antibiyotiklere karşı direnç oranları gittikçe artmaktadır.<sup>48, 106</sup> “EuSCAPE” verilerine göre, Türkiye’den gönderilen 112 KDKP izolatından KOL duyarlılığı araştırılan 66 izolatın 19’u (%28.8), TG duyarlılığı araştırılan 27 izolatın ise yedisi (%25.9) dirençli olarak belirlenmiştir. Bu 112 izolatın 24’ünün (%21.4) test edilen diğer tüm antibiyotiklere dirençli olduğu saptanmıştır.<sup>107</sup> Bu çalışmada KOL direnci %58, TG direnci ise %79 olarak bulunmuştur. TG ve KOL için çalışmamızda saptadığımız yüksek direnç oranları, antibiyotik direncinin ne denli hızlı yaygınlaştığını ve endişe verici boyutta olduğunu bir kez daha göstermektedir.

Örneklerin gönderildiği klinikler karbapenem duyarlılığındaki azalma açısından karşılaştırıldığında; YBÜ’nden gelen örneklerden izole edilen suşlarda meropenem ve imipenem duyarlılığının belirgin olarak azalmış olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ). Ertapenem için ise anlamlı bir fark saptanmamıştır ( $p > 0,05$ ). Bu duruma YBÜ’nde yatan hastaların tedavilerinde geniş spektrumlu antibiyotiklerin özellikle de karbapenem grubunun sık kullanılmasının neden olabileceği düşünülmüştür.

KÜE enfeksiyonu için tedavi seçimi tartışmalıdır. İn vitro çalışmalar, bakteriler tek tek ilaçlara dirençli olsa bile, çeşitli antibiyotik kombinasyonlarının KÜE’ye karşı artmış etkinlikte olduğunu göstermiştir. Aminoglikozit, karbapenem, KOL, TG veya fosfomisin içeren ikili ve üçlü kombinasyonlar için sinerjik veya bakterisidal etkiler bildirilmiştir.<sup>108, 109, 110, 111</sup> Klinik çalışmalar, KÜE ile oluşan ağır enfeksiyonlarda kombinasyon tedavisinin monoterapiden daha üstün olduğunu göstermektedir. Uygun görülen kombinasyonlar arasında KOL+TG, KOL+karbapenem, KOL+aminoglikozid ve karbapenem+aminoglikozid bulunmaktadır. Bu antibiyotiklerle yapılan diğer çift veya üçlü kombinasyonlar da değişken başarılarla kullanılmıştır.<sup>112, 113</sup> Bir çalışmada kan akımı enfeksiyonlarında KOL+MEM+TG kombinasyonun %85.7 gibi yüksek bir hayatta kalma oranı sağladığı saptanmıştır.<sup>114</sup> Oliva ve ark.<sup>115</sup> yayınladıkları vakada KOL+MEM+ETP

kombinasyonunun, yüksek MİK varlığında bile, kan dolaşım enfeksiyonuna neden olan bir “PDR” *K.pneumoniae*’ya karşı sinerjik ve etkili olduğunu göstermişlerdir.

Bu çalışmada “PDR” *K. pneumoniae* izole edilen dört hasta, MEM+ETP, ETP+PIPTAZ, AM+MEM+TG, SXT+CN kombinasyonları kullanılarak, sırası ile 10, 8, 7 ve 10 günde tedavi edilebilmişlerdir. Ancak diğer iki “PDR” izolatın birinde, MEM+TG ile 17 gün, diğerinde MEM 40 gün +COL 20 gün + TG ile 14 gün tedaviye rağmen kültür pozitifliği devam etmiştir. Aynı şekilde ÇİD olan altı izolat TG, MEM+TG+AM, MEM+KOL+TG ve AM+SXT ile tedavilerine rağmen kür edilememiş, tekrarlayan kültürlerde pozitiflik devam etmiştir. Bu hastaların biri hariç hepsinde KVH, SVH, diyabet, KBY, malignite ve immünsüpresyon gibi eşlik eden hastalık mevcuttur.

Verilen tedaviler ile kür edilen ancak KDKP ile tekrarlayan enfeksiyon geçiren altı hastada malignite, KBY, KVH, immünsüpresyon ve HT gibi çeşitli eşlik eden hastalıkları olduğu belirlenmiştir. Bu hastaların tekrarlayan enfeksiyonlarının nedeni olarak, KDKP ile rektal kolonize olabilecekleri düşünülmüştür. Fakat hastalardan tarama kültürü olarak rektal sürüntü örneği alınmadığı için hastaların taşıyıcılığı konusunda bir yorum yapılamamıştır. Hastalardan izole edilen KDKP izolatlarının taşıdıkları karbapenem genleri ile tedaviye direnç arasında herhangi bir ilişki kurulamamıştır (p >0,05).

Genellikle diğer antibiyotiklerle birlikte KÜE tedavisinde omurga ajan haline gelen KOL monoterapisi mortaliteyi arttırdığı için önerilmemektedir.<sup>110</sup> Aynı şekilde TG’nin de tek başına kullanımında geniş spektrumlu betalaktamlara kıyasla mortaliteyi arttırdığı yönünde bildirim mevcuttur.<sup>116</sup>

Hastane bilgi sisteminden verilerine ulaşabildiğimiz kadarıyla 100 hastadan 32’sinin KDKP’nin etken olduğu enfeksiyonları tedavi edilmiştir. Bunların altısında TG, AM, KOL, SXT, MEM ve ETP tek başına etkili olmuştur. Diğer kür olan hastalarda ise en çok MEM+TG+KOL, MEM+AM, MEM+COL ve AM+MEM+TG kombinasyonları etkili olmuştur.

Geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemlerin yoğun kullanılması bu dirençli bakterilerle kolonizasyon ve enfeksiyon gelişiminde önemli bir risk faktörüdür.<sup>117, 118</sup> Bu çalışmada, suşların izole edildiği hastalara ait ulaşılabilen veriler değerlendirildiğinde, son bir aydaki karbapenem kullanımını %39, sefalosporin kullanımını ise %29 olarak

belirlenmiştir. Karbapenemaz üreten *K.pneumoniae*'da diğer risk faktörleri, uzun süre yatağa bağımlı kalma, yoğun bakım ünitesinde bulunma, cerrahi müdahale geçirmiş olma, immün süpresyon ve trakeotomi, mekanik ventilasyon, SVK gibi invaziv araç kullanımı olarak belirtilmiştir.<sup>107, 117, 118, 119, 120</sup>

“CDC”nin KDE ile enfekte hastalardaki komorbid hastalık, invaziv kateter, dren varlığı ve yaşı değerlendirdiği çalışmada, median yaşının 66 olduğu, hastaların sadece %9'unun komorbid eşlik eden hastalığı olmadığı ve %75'inin üriner kateteri olduğu, %43'ünün SVK'i olduğu görülmüştür.<sup>121</sup> Bunlara ek olarak endemik bölgelere, özellikle de medikal turizm amacıyla yapılan seyahat de önemli risk faktörleri arasında sayılmıştır.<sup>48</sup> Çalışmamızda yukarıda belirtilen çalışmaları destekler nitelikte bulgular elde edilmiş olup, hastaların %53'ünde YBÜ'nde bulunma, %39'unda majör cerrahi geçirme, %27'sinde immün süpresyon, %40'ında malignite, %30'unda diyabet, %43'ünde HT, %24'ünde KBY, %24'ünde SVH, %19'unda MV, %11'inde SVK, %11'inde trakeotomi, %30'unda üriner kateter, %29'unda KVH, %14'ünde pulmoner hastalık varlığı saptanmıştır.

Yaş, MV, malignite, kalp hastalığı ve YBÜ'nde bulunma KDKP ile enfekte hastalarda yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir.<sup>117, 119, 122, 123</sup> Bu çalışmada incelenen KDKP suşlarının izole edildiği hastaların %22'sinin vefat ettiği belirlenmiştir. Yukarıdaki çalışmalara benzer şekilde, vefat eden hastalarda çeşitli risk faktörleri saptanmıştır. Onbir hastanın dış merkez YBÜ'ne transferi nedeniyle, 23 hastanın ise kayıtlı ayrıntılı bilgisine ulaşamaması nedeniyle eşlik eden hastalıklarının olup olmadığı değerlendirilememiş olup, çalışmamızın kısıtlı bir yönü olarak değerlendirilmiştir.

Bu bilgiler ışığında KDE izole edildiği bildirildiğinde, bulaşın önlenmesi için acilen enfeksiyon kontrol önlemleri alınmalıdır. Hastalara, mümkünse tek kişilik odada, mümkün değilse, aynı etkeni bulunduran hastalar bir arada kohortlama uygulanarak sıkı temas izolasyonu uygulanmalıdır. Kullanılacak tansiyon aleti gibi tıbbi araç gereçleri sadece o hastalarda kullanılmalı ve dezenfekte edilmeden odadan çıkarılmamalıdır.<sup>95</sup>

Karbapenemazlar plazmidlerle transfer edildiğinden, hem *Enterobacteriaceae* hem de non fermentatif bakteriler bu plazmitlerin taşınmasında ve yayılmasında görev yaparlar. Direnç genlerini taşıyan organizmaların intestinal taşıyıcılığı hastanelerde çapraz bulaşa

neden olabilir. Bu nedenle, intestinal taşıyıcılığın saptanmasına yönelik enfeksiyon kontrol programları, bu patojenlerin yayılmasını sınırlamak açısından önemlidir.<sup>18</sup>

Çeşitli çalışmalar, karbapenemaz üreten organizmalara bağlı enfeksiyonların etkin kontrolü için intestinal taşıyıcılığın saptanmasının önemini vurgulamaktadır.<sup>18, 124</sup> New York'ta yapılan bir çalışmada, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* ve *A. baumannii* için rektal sürüntü kültürlerinde intestinal taşıyıcılık taraması pozitif çıkan hastaların izole edilmesi ve YBÜ'nde uygulanan enfeksiyon kontrol programı sayesinde 1 yıl sonra intestinal taşıyıcılık oranında önemli bir azalma olduğu saptanmıştır. Ayrıca yeni KPC üreten *K. pneumoniae* vakalarının ortalama sayısını 1.000 hasta gününde 9.7'den 3.7'ye düşürmeyi başarmışlardır.<sup>124</sup> Çeşitli çalışmalarda, klinik kültürlerin KDE ile kolonize olan hastaların sadece bir bölümünü tanımladığı ileri sürülmüştür. İsrail'de bir hastanede yatan hastalarda KDKP'nin rektal taşıyıcılık oranını %5.4 olarak bildiren bir nokta prevelans çalışmasında, hastaların üçte birinden daha azının KDKP için pozitif klinik kültürleri sahip olduğu saptanmıştır.<sup>125</sup> Rektal tarama kültürleri her klinikte maliyet etkin olmasa da YBÜ gibi özellikli bölümlere hasta kabulünde, endemik bir bölgeden gelen ya da daha önceden KDKP pozitif olduğu bilinen hastaların kabulünde, kolonizasyonun erken tespiti amacıyla yararlı olabilir. Yayılımın önlenmesinde alınabilecek diğer önlemler ise uygun antimikrobiyal kullanımına ek olarak üriner kateter, santral venöz kateter gibi invaziv araçların kullanımını azaltmak, kullanılan araçların bakımının aseptik şartlarda çok iyi yapılması olarak belirtilmiştir.<sup>126</sup>

Yapılan bu çalışmada multipleks PZR yöntemi ile karbapenem direnci belirlenen 100 izolatın 95'inde en az bir karbapenemaz geni belirlenmiş olup, beş izolatta karbapenemaz genleri açısından negatif sonuç alınmıştır. Geriye dönük olarak, suşların Vitek-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistem sonuçları incelendiğinde, bu beş izolatın üçünde yüksek düzey AmpC üretimi ve eşlik eden membran geçirgenliğinde azalma; diğer ikisinde ise GSBL üretimi olduğu belirlenmiştir.

İzolatlarda araştırılan beş karbapenemaz geninden *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* ve *bla<sub>VIM</sub>* gen pozitifliklerine rastlanırken *bla<sub>IMP</sub>* gen pozitifliğine rastlanmamıştır.

Ülkemizde endemik olan OXA-48 enzimi, ilk kez 2001 yılında saptandıktan sonra artan sıklıkta bildirimleri devam etmiştir. OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* izolatları ile ortaya

çıkan ilk salgın ise 2008 yılında bildirilmiştir. İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde ortaya çıkan bu salgında Mayıs 2006 ile Şubat 2007 ayları arasında toplanan 39 izolatın hepsinin OXA-48 pozitif olduğu saptanmıştır.<sup>127</sup> Yapılan çeşitli çalışmalarda ülkemizde enterik bakterilerde halen en sık saptanan karbapenemaz enzimi OXA-48 olarak raporlanmaktadır.<sup>51, 53, 61, 128, 129</sup> OXA-48, NDM, KPC, VIM ve IMP genlerinin HyplexSuperBug ID kiti ile araştırıldığı bir çalışmada 2012 yılında izole edilen 95 enterik bakterinin 57'si karbapenemaz pozitif olarak saptanmıştır. Bunların 49 tanesi (%86) OXA-48 pozitif olarak belirlenmiştir.<sup>51</sup> Azap ve ark.<sup>128</sup> 2007-2011 yılları arasında Başkent Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen karbapenem dirençli 16 *K. pneumoniae*'nin moleküler epidemiyolojisini araştırdıkları çalışmada, izolatların hepsinde OXA-48 geni bulunurken KPC, NDM, GES, IMP ve VIM genlerine rastlamamışlardır. Çizmeci ve ark.<sup>129</sup> 2014-2016 yıllarında topladıkları 76 KDE izolatının 52'sinde (%68.4) OXA-48 geni saptadıklarını bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda da en sık saptanan gen OXA-48 (%81.05) olmuştur ve ülkemizdeki diğer çalışmalarla örtüşmektedir. Suşların %53.6'sında tek başına, %26.3'ünde NDM ile birlikte, %1.05'inde ise KPC ile birlikte OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. YBÜ'lerindeki hastalardan izole edilen suşların %52.6'sında tek başına, %42.1'inde NDM ile birlikte olmak üzere suşların %94.7'sinde OXA-48 pozitifliği saptanmıştır. YBÜ gibi riskli bir bölümde en sık görülen enzim halen OXA-48 olmakla birlikte, ÇİD ve "PDR" a neden olabilen NDM enzim pozitifliğinin artmış olması endişe vericidir.

MBL sınıfından klinik olarak en önemli enzim olan NDM dünyada ilk kez 2009 yılında, Hindistan'a seyahat öyküsü olan bir hastadan izole edilmiş ve bu tarihten itibaren hızla yayılmaya başlamıştır.<sup>67</sup> Endemik olduğu Hindistan, Pakistan ve Bangladeş dışında dünya genelinde de birçok ülkeden bildirimler yapılmıştır.<sup>17, 130, 131, 132</sup>

Ülkemizdeki ilk *bla<sub>NDM</sub>* bildirimini ise 2012 yılında yapılmıştır.<sup>70</sup> Sonrasında da ülkemizden bildirimler yapılmaya devam etmiştir.<sup>51, 52, 54, 71, 129</sup> Alp ve ark.<sup>71</sup> 2010-2011 yılları arasında topladıkları 137 KDKP izolatının %4.4'ünde, Demir ve ark.<sup>51</sup> 2012 yılında izole ettikleri 95 enterik bakterinin %6.3'ünde, Poirel ve ark.<sup>54</sup> yaptıkları çalışmada %18.2'si *K.pneumoniae*'da, %36.4'ü *E.cloacae*'de olmak üzere 2013 yılında izole ettikleri 22 KDE izolatının %54.6'sında, Çakar ve ark.<sup>52</sup> "EuSCAPE" projesi kapsamında, 2014 yılında çeşitli merkezlerden topladıkları 143 adet KDE'nin %6.3'ünde, Çizmeci ve ark.<sup>129</sup>

2014-2016 yılları arasında topladıkları 76 adet KDE izolatının % 22.3'ünde *bla<sub>NDM</sub>* saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada ikinci sıklıkta saptanan karbapenemaz geni *bla<sub>NDM</sub>* (%38.9) olmuştur. Suşların %9.5'inde tek başına, %26.3'ünde ise *bla<sub>OXA-48</sub>* ile birlikte, %2.1'inde *bla<sub>KPC</sub>* ile birlikte, %1.05'inde *bla<sub>VIM</sub>* ile birlikte *bla<sub>NDM</sub>* pozitifliği saptanmıştır. Yukarıda belirtilen çalışmalarla karşılaştırıldığında çok daha yüksek bir oranda *bla<sub>NDM</sub>* saptadığımız görülmektedir. Hızla yayılan NDM enziminin önümüzdeki yıllarda, ülkemizde endemik bir şekilde saptanmaya başlayacağı öngörülebilir.

Sınıf A karbapenemazlar içerisindeki en önemli enzim *bla<sub>KPC</sub>* olup 1996 yılında ABD'de ilk defa saptanmıştır.<sup>42</sup> ABD, Çin, İtalya, İsrail ve Yunanistan'da endemik olarak bulunmaktadır.<sup>133</sup> İspanya, Fransa, Almanya, İsveç ve Finlandiya gibi Avrupa ülkeleriyle Hindistan, Güney Kore ve Avustralya gibi Asya pasifik bölgelerinde de sporadik olarak bildirimler yapılmaktadır.<sup>17, 133</sup>

Yunanistan'daki ilk KPC pozitifliği 2007 yılında bildirilmiştir.<sup>134</sup> Yunanistan'da 3. basamak bir hastaneden izole edilen karbapenemaz pozitif *K.pneumoniae*'larda KPC üretimi 2003'te %0'dan 2010'da %38.3'e çıkmıştır.<sup>135</sup> Giani ve ark.<sup>136</sup> çalışmalarında İtalya'daki karbapenemaz üreten izolatların %89.5'inin KPC, %9.2'sinin VIM ve %1.3'ünün de OXA-48 pozitif olduğunu belirterek KPC'nin ülkede endemik olduğunu vurgulamışlardır. Ülkemizde *bla<sub>KPC</sub>* ilk kez 2014 yılında Labarca ve ark.<sup>50</sup> tarafından bildirilmiş olup, sonrasında çoğu çalışmada saptanamamıştır.<sup>51, 52, 129</sup> Nadir olarak izole edildiği bildirimlerde mevcuttur.<sup>54, 55</sup> Özbek ve ark.<sup>55</sup> 2011 yılının ilk yarısında izole ettikleri 40 KDE'de bir *E.coli* izolatında *bla<sub>KPC</sub>* saptamışlardır. İstanbul'da bir üniversite hastanesinden 2013 yılında izole edilen 22 KDE arasından iki *K.pneumoniae* izolatında *bla<sub>KPC-2</sub>* saptandığı bildirilmiştir.<sup>54</sup> Bu çalışmada üçüncü sıklıkla saptadığımız gen *bla<sub>KPC</sub>* (%9.5) olup, suşların %6.3'ünde tek başına, %2.1'inde NDM ile birlikte ve %1.05'inde OXA-48 ile birlikte saptanmıştır. Ülkemizde yapılan önceki çalışmalar ile karşılaştırıldığında oldukça yüksek oranda saptadığımız bu enzimin de yıllar içinde ülkemizde de sık belirlenir hale geldiği görülmektedir.

İlk defa bir *Pseudomonas* izolatında Lauretti ve ark.<sup>62</sup> tarafından tanımlanan *bla<sub>VIM</sub>*, *Enterobacteriaceae*'ya yayılım gösterdiği Yunanistan'da bir *E.coli* suşunda belirlenmiştir.<sup>137</sup> VIM üreten *K.pneumoniae* izolatları dünya genelinde artan sıklıkta bildirilmektedir.<sup>138, 139, 140, 141</sup> Giakkoupi ve ark.<sup>139</sup> 2002 yılında Yunanistan'daki üç

hastanenin YBÜ'lerinden 17 adet *bla*<sub>VIM-1</sub> taşıdığı saptanan *K.pneumoniae* izole ettiklerini bildirmişlerdir. Sedighi ve ark.<sup>141</sup> İranda'ki iki farklı hastaneden Nisan 2014- Mart 2015 yılları arasında izole edilen 100 *K.pneumoniae* izolatında yaptıkları multipleks PZR ile suşların %33'ünde *bla*<sub>VIM</sub> saptamışlardır. Başta *K. pneumoniae* olmak üzere VIM üreten *Enterobacteriaceae*'nin diğer Avrupa ülkelerine yayılmasında, Yunanistan kaynak ülke olarak kabul edilmiştir.<sup>142</sup>

Ülkemizde ilk VIM-1 *K.pneumoniae* izolatında 2007 yılında Yıldırım ve ark.<sup>66</sup> tarafından bildirilmiştir. Özbek ve ark.<sup>55</sup> 2011 yılında HK enfeksiyon etkeni olarak izole ettikleri 40 karbapenem dirençli enterik bakteri ile yaptıkları çalışmada altı izolatta (3 *K.pneumoniae*, 2 *E.cloacae* ve 1 *E.coli*) *bla*<sub>VIM</sub> saptamışlardır. Demir ve ark.<sup>51</sup> 2012 yılında izole edilen 80 karbapenem dirençli enterik bakteri ile yaptıkları çalışmada izolatların 57'sinde karbapenemaz üretimi saptadıklarını ve bunlardan sadece iki (%3.5) izolatta (*E.cloacae*) *bla*<sub>VIM</sub> olduğunu raporlamışlardır. Baran ve ark.<sup>53</sup> ise 2013 yılında izole edilen 181 KDE suşu ile yaptıkları multipleks PZR'da sadece bir *K.pneumoniae* suşunda *bla*<sub>VIM</sub> saptamışlardır. Çakar ve ark.<sup>52</sup> "EuSCAPE" projesi kapsamında, 2014 yılının ilk yarısında Türkiye'nin değişik bölgelerindeki merkezlerden izole edilen karbapenem dirençli 155 klinik izolat [21'i (%13.5) *E.coli*, 134'ü (%86.5) *K.pneumoniae*] ile yaptıkları çalışmada, tümü *K.pneumoniae*'da olmak üzere izolatların %5.6'sında *bla*<sub>VIM</sub> saptadıklarını ve dağılımının tek başına VIM: 4 (%2.8), OXA-48+VIM: 3 (%2.1); VIM+NDM: 1 (%0.7) şeklinde olduğunu raporlamışlardır. Çizmeci ve ark.<sup>129</sup> 2014-2016 yılları arasında izole edilmiş 76 KDE içinde sadece iki izolatta (*K.pneumoniae*, *E.cloacae*) VIM saptadıklarını bildirmişlerdir. *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> genini birlikte saptadıkları tek izolatın da EuSCAPE projesi kapsamında, Kocaeli Üniversitesi Hastanesi'nden gönderildiği belirlenmiştir. Bu projeden bir yıl sonra bu çalışma için topladığımız 100 KDKP içinde VIM+NDM üreten sadece bir izolat saptamış olmamız, bu gen paterninin önceki yıllarda da hastanemizde var olmasına rağmen, görülme sıklığının yıllar içinde artmamış olması sevindiricidir. Ayrıca yukarıda belirtilen yayınlardan da anlaşıldığı üzere ülkemiz genelinde de VIM enziminin sıklığında bir artış olmamıştır.

Enterik bakterilerde tek bir izolatta farklı karbapenemazların birlikte üretilmesi dikkat çekici bir şekilde pek çok yayında bildirilmiştir. İtalya'da Perilli ve ark.<sup>143</sup> *K.pneumoniae* izolatlarında KPC-3+VIM-2, Richter ve ark.<sup>144</sup> KPC-2+VIM-1, Çin'de Chen ve ark.<sup>145</sup>



NDM-1+IMP-4, Liu ve ark.<sup>146</sup> KPC-2+NDM-1, İsviçre’de Seiffert ve ark.<sup>147</sup> OXA-48+NDM-1, Brezilya’da Pereira ve ark.<sup>148</sup> *Enterobacter hormaechei*’de KPC-2+NDM-1 saptandığını bildirmişlerdir. Hindistan’da da OXA-181+VIM-5 bildirimleri yapılmıştır.<sup>68</sup> Hatta Fas’dan NDM-1, VIM-1 ve OXA-48 in üçünü de üreten bir *K.pneumoniae* izolatı tanımlanmıştır.<sup>149</sup>

OXA-48+NDM-1 üreten *K.pneumoniae* suşu ülkemizde ilk kez Kılıç ve ark.<sup>150</sup> tarafından raporlanmıştır. Sonrasında da pek çok çalışmada OXA-48+NDM-1 bildirim yapılmıştır.<sup>52, 53, 72, 129, 151</sup> Çakar ve ark.<sup>52</sup> 2014 yılında ülkemizde yapılan çok merkezli bir çalışmada 155 karbapenem dirençli enterik bakteri içersinde yedi *K.pneumoniae* izolatında iki enzim bir arada (OXA-48+NDM: 3; OXA-48+VIM: 3; VIM+NDM: 1) saptamışlardır. Baran ve ark.<sup>53</sup> ise 181 KDE ile yaptıkları çalışmada sadece üç suşun OXA-48+NDM, bir suşun OXA-48+VIM ürettiğini raporlamışlardır. Çizmeci ve ark.<sup>129</sup> ise 2014-2016 yılları arasında topladıkları 76 karbapenem dirençli enterik bakteriyle yapılan multipleks PZR sonucunda OXA-48+NDM ve OXA-48+VIM üreten iki *K.pneumoniae* izolatı bildirmişlerdir.

Yukarıda belirtilen çalışmalardan yaklaşık bir –iki yıl sonra bu çalışma için toplanmış olan karbapenemaz enzimi üreten 95 *K.pneumoniae* izolatının 25’inde (% 26.3) OXA-48+NDM, ikisinde (%2.1) KPC+NDM, birer tanesinde de OXA-48+KPC (%1.05) ve NDM+VIM (%1.05) saptanmıştır. Diğer çalışmalarla karşılaştırıldığında OXA-48+NDM üreten suşların oranının çok yüksek olduğu görülmektedir. Bu durumun muhtemel nedeni bir sanayi şehri olan Kocaeli ilinin farklı coğrafik bölgelerden fazla sayıda göç alması olabilir. Birden fazla enzim taşıyan karbapenem dirençli izolat oranlarının hızlı bir şekilde artması tedavi seçeneklerinin tükenmesine neden olduğu için hem hastanemiz hem de ülkemiz için büyük bir tehdit teşkil etmektedir.

Azap ve ark.<sup>128</sup> OXA-48 pozitif olarak saptadıkları 16 KDKP izolatının hepsini AK ve KOL duyarlı bulmuştur. Bu çalışmada ise sadece OXA-48 pozitifliği tespit edilen izolatların en duyarlı olduğu antibiyotiğin AK ve SXT olduğu, KOL ve TG’ne genellikle dirençli oldukları görülmüştür. Diğer taraftan, OXA-48 pozitif izolatlarda İPM ve MEM duyarlı sınırlarda olabileceği bildirilmekteyse de, bu çalışmada sadece OXA-48 pozitifliği tespit edilmiş 51 izolatın İPM ve MEM için yüksek MİK değerleri ile direnç gösterdiği görülmüş olup (20. Çizelge) direnç oranları sırasıyla %80.4 ve %84.4 olarak saptanmıştır.

Nitekim, Azap ve ark.<sup>128</sup>'nın çalışmasında da imipenem ve meropenem için yüksek MİK değerleri saptanmış, bunun nedeni olarak da suşlarda saptanan TEM ve SHV tipi GSBL ve dış membran porin kaybı gösterilmiştir.

Genel olarak MBL üreten izolatların, OXA-48 ve KPC tipi enzim üreten suşlara göre daha yüksek düzeyde dirence neden olduğu bilinmektedir. *bla<sub>NDM</sub>* genini taşıyan plazmidler diğer karbapenemaz, ESBL, aminoglikozit (16S RNA metilazlar), makrolid (esteraz), rifampin (rifampin modifiye edici enzimler) ve sülfametoksazol direnç genlerini barındırabilir ve çoklu ilaç direncine sebep olabilirler. NDM-1 pozitif izolatlar sadece tigesiklin, kolistin ve daha az oranda fosfomisin'e duyarlı olarak saptanırlar.<sup>8, 152</sup> Bu çalışmada da literatürü destekler nitelikte bulgular elde edilmiştir. NDM pozitifliği belirlenen 37 izolatın hepsi her üç karbapeneme karşı yüksek MİK değerleri ile dirençli olarak saptanmıştır (20. Çizelge). Çalıştığımız antibiyotiklerin hepsine dirençli olarak saptanan “PDR” 11 izolatın dokuzunu OXA-48+NDM pozitif, ikisini sadece NDM üreten izolatlar oluşturmaktadır.

KPC üreten izolatlarda karbapenem direnç seviyesinin belirgin olarak değişebileceği ve ertapenemin en düşük aktiviteye sahip olan karbapenem olarak bildirilmesine karşın<sup>8</sup> bu çalışmada KPC pozitifliği saptanan 9 izolatta her üç karbapenem antibiyotik için yüksek MİK değerleri saptanmıştır (20. Çizelge). KPC üreticileri genellikle çok ilaca dirençlidir ve KPC ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için terapötik seçenekler sınırlı kalmaktadır. Benzer şekilde bu çalışmada da KPC pozitif izolatlar nerdeyse tüm antibiyotiklere dirençli olarak saptanmıştır. Halen kullanılan aminoglikozidler arasında sadece gentamisin, iyi bir etkinliği olduğu bildirilmektedir.<sup>152</sup> Bu çalışmada da KPC pozitif izolatlara karşı en duyarlı antibiyotik gentamisin olarak belirlenmiştir.

Çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş HK enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilen 84 *K.pneumoniae* izolatının birbirleriyle olan klonal ilişkisi PFGE yöntemiyle araştırılmış olup 24 farklı klon tespit edilmiştir. Hastanemizdeki *K.pneumoniae* suşlarının önemli kısmının birbiriyle klonal ilişkili olduğu görülmüş olmakla birlikte farklı klonların bulunması salgınların birçok farklı kökenden oluşmasını da mümkün kılmaktadır. PFGE yöntemi kısa süreli salgınlarda klonal olarak izolatların tiplendirilmesi ve kaynağın belirlenmesinde ayırt edici gücü yüksek olan bir metod olmakla beraber altı aydan uzun

süren izolatların toplandığı çalışmalarda tiplendirme yöntemi olarak ayırt edici özelliği azalmaktadır.<sup>93</sup>

Us ve ark.<sup>6</sup> 2004- 2007 yılları arasında topladıkları karbapenem dirençli 26 izolatın PFGE ile tiplendirilmesinde 7 farklı patern, Azap ve ark.<sup>128</sup> 2007-2011 yılları arasında Başkent Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen karbapenem dirençli 16 *K. pneumoniae* izolatında 8 patern bildirmişlerdir. Ordu Üniversitesi Tıp Fakültesi YBÜ'den 2014 Ekim-Aralık ayları içinde izole edilen 20 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının PFGE ile yapılan klonal araştırmasında üç farklı pulsotipe ayrıldığı gözlenmiştir. Bununla birlikte suşların tek bir klonda yoğunlaştığı ve bunun salgın izolatı olarak değerlendirildiği bildirilmiştir.<sup>153</sup> Brezilya'da 2008-2010 yılları arasında karbapenem dirençli *K. pneumoniae* salgınının epidemiyolojisinin araştırıldığı bir çalışmada 33 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin PFGE ile beş moleküler tipe ayrıldığını [genotip A'da beş (%15), B'de 18 (%55), C'de sekiz (%24) ve iki bağımsız profil] belirlemişlerdir. Chen ve ark.<sup>154</sup> 20 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatında beş PFGE tipi saptamıştır. Bununla birlikte Giani ve ark.<sup>155</sup> 2011-2013 tarihleri arasında izole edilmiş 59 KOL dirençli KDKP izolatının 56'sının tek bir paterne ve aynı ST'ye sahip olduklarını bildirmişler ve bunu büyük bir nozokomiyal salgın olarak değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada da 2015-20017 tarihleri arasında izole edilen HK enfeksiyon etkeni 84 *Klebsiella pneumoniae* suşu PFGE yöntemi ile tiplendirilmiş ve 24 patern belirlenmiştir. Yirmidört patern içersinde Pulsotip A en büyük grubu oluşturmuş olup 21 izolatın klonal olarak aynı kökenden kaynaklandığı belirlenmiştir. Bu klon içersinde 26.6.2015-06.07.2015 tarihleri arasındaki 2 haftalık süreçte dahili YBÜ'nde küçük bir salgının patlak verdiği belirlenmiştir (20. Çizelge). Yakın tarihte aynı şekilde hematoloji- onkoloji servisinde de 3 hastaya ait izolatın aynı klonal paterne sahip olduğu görülmüştür. İkinci sıklıkta 11'er izolatın yer aldığı Pulsotip B ve C, 10 suşla pusotip D görülmektedir. Pulsotip C'de yine dahili yoğun bakım ünitesinde 3 hasta ile sınırlı bir patlak oluşturduğu belirlenmiştir. Us ve ark.<sup>6</sup> Ankara Üniversitesi Hastanesi'nde yaptıkları çalışmada, PFGE yöntemi ile tiplendirdikleri *K. pneumoniae* izolatlarından 2006 yılında izole edilen B paternindeki altı suşun antibiyotik duyarlılıklarının aynı olduğu ve hepsinin YBÜ'ndeki hastalardan izole edilmesinin, hastadan hastaya yayılımı vurguladığını belirtmişlerdir. PFGE yöntemi ile D paterni olarak belirlenen izolatların farklı kliniklerde olmakla birlikte aynı tarihte hastanemizde yaygın olarak görüldüğü belirlenmiştir.

A ve B paterninde bulunan 32 suşun %84.3'ü sadece *bla*<sub>OXA-48</sub> geni taşıırken C ve D paternlerinde bulunan suşların %76.2'nin *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>OXA-48 +NDM</sub> geni taşıdıkları belirlenmiştir. Hastanemizde karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında *bla*<sub>NDM</sub> geni, yıllar içersinde hızla artarak *bla*<sub>OXA-48</sub>'den sonra endemik olarak değerlendirilebilecek düzeye ulaşmıştır.

Pulsotip E'de yer alan 6 izolatın dört tanesi *bla*<sub>KPC</sub> geni taşıyor olup, suşlardan bir tanesinin ise *bla*<sub>OXA-48 +KPC</sub> genini birlikte taşıdığı saptanmıştır. Literatür araştırmasında bu iki geni bir arada taşıyan izolat bildirimine rastlanmamıştır.

Farklı bir patern olarak değerlendirilen pulsotip I'daki izolatların her ikisi de *bla*<sub>KPC+NDM</sub> geni taşıyor olup 2017 yılında hastanemize dış merkezden sevk edilen hastalardır ve yine ülkemizde bu genleri taşıyan bir izolat daha önce bildirilmemiştir.

Antibiyotik duyarlılıklarına ve taşıdıkları direnç genlerine göre PFGE paternleri değerlendirildiğinde; aynı paternde olup farklı antibiyotik duyarlılığı ve farklı direnç genleri taşıyan izolatlar bulunmaktadır (20. ve 21. Çizelgeler). 2013 yılında ülkemizde yapılan bir çalışmada 22 karbapenem dirençli enterik bakterinin klonal ilişkisi PFGE ve Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) yöntemiyle araştırılmıştır. KPC-2 pozitif iki *K.pneumoniae* suşunun klonal olarak ilişkili ve aynı sekans tipine ait olduğu (ST307) halde; dört NDM-1 pozitif *K.pneumoniae* suşunun klonal olarak ilişkisiz ve farklı ST'lere ait olduğu (ST15, ST45, ST278 ve ST159) saptanmış; altı OXA-48 pozitif *K.pneumoniae* izolatının hepsinin klonal olarak ilişkili ve ST101 klonuna ait olduğu gösterilmiştir.<sup>54</sup> Benzer durum Chen ve ark.<sup>154</sup>'ın çalışmasında da belirtilmiş olup, bakterinin yayılması sırasında bazı özelliklerini değiştirebileceğinden ya da direnç genlerini zamanla kaybedip/kazanabileceğinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak tek bir salgının değerlendirilmesinde PFGE yönteminin ayırt edici gücü bakımından değerli bir yöntem olduğu tartışılmaz olmakla beraber, majör epidemik klonların saptanmasında ve kökenin belirlenmesinde “MLST” yönteminin ayırt edici gücünün daha yüksek olduğu bilinmektedir. Çalışmamızda elde edilen PFGE paternlerinin “MLST” yöntemi ile sekans tiplerinin belirlenmesi maddi kaynakların yetersizliği nedeni ile yapılamamış olup bir sonraki çalışma olarak planlanmıştır.

Karbapenemaz üreten bakteriler ile enfeksiyon çoğunlukla HK olmakla birlikte TK izolatlara da rastlanılmaktadır.<sup>142, 156</sup> Nozokomiyal izolatlarda çoğunlukla *bla*<sub>KPC</sub>

saptanırken, *bla<sub>NDM</sub>* ve *bla<sub>OXA-48</sub>*'e hem nozokomiyal hem de TK patojenler arasında rastlanabilmektedir.<sup>17</sup> Senegal'den yapılan bir bildirimde, bölgede *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitif izolatların hem HK hem de TK enfeksiyonlarda görülmeye başladığı ifade edilmiştir.<sup>157</sup> Bizim çalışmamızda ise TK enfeksiyon etkeni olarak sınıflandırdığımız 16 izolatın 11'inde sadece *bla<sub>OXA-48</sub>* pozitifliği saptanırken, beş suşta *bla<sub>OXA-48+NDM</sub>* pozitifliği saptanmıştır. *bla<sub>KPC</sub>* saptadığımız suşların hepsi HK enfeksiyon etkenidir. Bu bulgular yukarıda tartışılan çalışmaları desteklemektedir. OXA-48 enziminin endemik olduğu ülkemizde, ÇİD ve “PDR” a neden olabilen NDM pozitif enterobacteriaecae üyelerinin de TK enfeksiyonlarda karşımıza çıkabileceği unutulmamalıdır.

Bu çalışmanın sonucu olarak, ülkemizde endemik olarak bulunan OXA-48 pozitif izolatların yanında artık NDM enzimi taşıyan izolatların da endemik düzeye ulaşmaya başladığı ve bu organizmalarla gelişen enfeksiyonların tedavilerinde kullanılacak antibiyotiklerin de gittikçe sınırlanmakta olduğunu yadsınamaz bir gerçektir. Bu durumun engellenebilmesi için özellikle YBÜ gibi riskli bölümlere yatış sırasında hastaların KÜE açısından gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin sıkı bir şekilde uygulanması yanısıra hastaneye yatışta KÜE açısından kontrol dışı tarama testlerinin yapılması uygun olacaktır.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ülkemizde endemik olarak bulunan OXA-48 pozitif izolatların yanında artık MBL sınıfından özellikle ÇİD ve “PDR” e neden olabilen NDM enzimi taşıyan izolatların da endemik düzeye ulaşmaya başladığı saptanmıştır.
2. Bu çalışmadaki izolatların %9.47’inde KPC enziminin saptanmış olması, sınıf A karbapenemaz grubunda bulunan ve genellikle “PDR” a neden olan KPC’nin, ülkemizde ilk kez saptandığı 2012 yılından sonraki 5 yılda yayılmaya başladığını göstermektedir.
3. Yaptığımız literatür taramasında ülkemizde, bir izolatta saptadığımız OXA-48+KPC ve iki izolatta saptadığımız KPC+NDM’nin birlikte üretiminin bildirildiği yayına rastlanmamış olup yaptığımız bildirim ülkemizde ilk olduğunu düşünmekteyiz.
4. *K.pneumoniae*’da karbapenemaz varlığının taranmasında en yüksek duyarlılık ertapenem ile saptanmıştır (%100).
5. Hastanemizde enfeksiyon etkeni olarak izole edilen 100 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatında, en yüksek direnç saptanan antimikrobiyal ajanlar ampicilin (% 100), amoksisilin-klavulanik asit (% 100) ve piperasilin-tazobaktam (%100) olmuştur. En duyarlı antimikrobiyal ajanlar ise kolistin (%42) ve amikasin (%39) olarak saptanmıştır.
6. YBÜ hastalarından izole edilen suşlarda meropenem ve imipenem duyarlılığının belirgin olarak azalmış olduğu saptanmıştır ( $p < 0,05$ ).
7. Sadece OXA-48 pozitif olduğu saptanan izolatların, diğer genleri içeren izolatlara göre anlamlı olarak meropeneme ( $p = 0,003$ ) ve imipeneme ( $p < 0,001$ ) duyarlı oldukları saptanmıştır.
8. Multipleks PZR ile 100 izolatın 95’inde en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır. Saptanan genlerin %81.05’inin *bla*<sub>OXA-48</sub>, %38.9’unun *bla*<sub>NDM</sub> ve %9.47’sinin *bla*<sub>KPC</sub> olduğu belirlenmiştir. Tek başına *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub> geni görülme sıklığı sırasıyla %53.6, %9.4 ve %6.3 olarak belirlenmiştir. *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub>’nin birlikte bulunma sıklığı %26.3, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub>’nin %2.1, *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>KPC</sub>’nin %1.05, *bla*<sub>NDM</sub> ve *bla*<sub>VIM</sub>’in %1.05 olarak saptanmıştır.

9. Genel olarak MBL üreten suşların daha yüksek düzeyde dirence neden olduğu bilinmektedir. Bizim çalışmamızda da “PDR” olarak saptanan 11 izolatin dokuzunu OXA-48+NDM pozitif, ikisini NDM ve OXA-48+KPC pozitif izolatlar oluşturmaktadır.
10. HK enfeksiyonlarda karbapenemaz direncine neden olarak sıklıkla *bla*<sub>KPC</sub> geni saptanırken, TK enfeksiyonlarda *bla*<sub>OXA-48</sub> ve *bla*<sub>NDM</sub> saptandığı bildirilmektedir. Bu çalışmada ise TK enfeksiyon etkeni olarak sınıflandırdığımız 16 izolatin 11’inde sadece OXA-48 pozitifliği saptanırken, beş suşta OXA-48+NDM pozitifliği saptanmıştır. *bla*<sub>KPC</sub> saptadığımız suşların hepsi HK enfeksiyon etkenidir. OXA-48’in endemik olduğu ülkemizde, ÇİD ve “PDR” a neden olabilen NDM pozitif *Enterobacteriaceae* üyelerinin de TK enfeksiyonlarda karşımıza çıkabileceği unutulmamalıdır.
11. Hastanemizdeki *K.pneumoniae* izolatlarının önemli kısmının dört yaygın klon içerisinde yer aldığı saptanmıştır.
12. KDE ailesinin aktarılabilir genetik elementlerinin topluluk içerisinde hızlı bir şekilde yayılması salgın yapma potansiyellerini arttırmaktadır. Dolayısıyla herhangi bir hasta örneğinden KDE izole edildiği bildirildiğinde, hastalar mümkünse tek kişilik odada, mümkün değilse, aynı etkeni bulunduran hastalar bir arada kohortlama uygulanarak sıkı temas izolasyonu uygulanmalıdır. YBÜ gibi riskli bölümlere yatış sırasında hastaların KÜE açısından kontrol dışı tarama testlerinin yapılması ve pozitiflik saptanan hastalardan bulaşın önlenmesi için acilen gerekli enfeksiyon kontrol önlemlerinin sıkı bir şekilde uygulanması önerilmektedir.

## 7. ÖZET

### Karbapenemaz Üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Moleküler

### Karakterizasyonu

#### Giriş ve amaç

Bu çalışma Ocak 2015 - Şubat 2017 tarihleri arasında Kocaeli Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakterioloji Birimi'ne gelen örneklerden izole edilmiş karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının sahip olduğu aktarılabılır karbapenemaz genlerinin tanımlanmasını ve görülme sıklığını konu alan ilk çalışma olup, hem hastanemiz hem de ülkemiz için epidemiyolojik veri sağlanmayı amaçlamıştır.

#### Gereç ve yöntem

Vitek-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile karbapenem grubu antibiyotiklerden herhangi birine azalmış duyarlılığı saptanan 100 adet *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. AMC, TZP ve SXT duyarlılıklarını belirlemek için disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Diğer antimikrobiyal ajanların (AMP, AK, İPM, MEM, ETP, CAZ, CTX, CİP, KOL, TG, CN) duyarlılıklarını belirlemek amacıyla agar dilüsyon yöntemiyle MİK değerleri saptanmıştır. Ülkemizde görülen *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> ve *bla*<sub>IMP</sub> genlerinin hastanemizdeki sıklığı iki farklı multipleks PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Ayrıca hastanemizden izole edilen KDKP suşlarının klonal olarak ilişkisini belirlemek amacıyla PFGE yöntemi kullanılmıştır.

#### Bulgular

Tüm suşlar için en yüksek direnç AMP (%100), AMC (%100) ve TZP (%100)'e karşı saptanmıştır. Direnç oranının giderek arttığı belirlenmekle beraber en duyarlı antibiyotik olarak KOL (%42) saptanmıştır. KDKP izolatlarının 95'inin karbapenemaz genlerinden en az birini taşıdığı multipleks PZR ile gösterilmiştir. Genlerin %81.05'inin *bla*<sub>OXA-48</sub>, %38.9'unun *bla*<sub>NDM</sub> ve %9.47'sinin *bla*<sub>KPC</sub> ve %1.05'inin *bla*<sub>VIM</sub> olduğu belirlenmiştir. Bir izolatın *bla*<sub>OXA-48+KPC</sub> genini, iki izolatın da *bla*<sub>KPC+NDM</sub> genini birlikte taşıdığı ilk kez belirlenmiştir. PFGE ile izolatların 24 farklı klona ayrıldığı tespit edilmiş olup %63.09'unun dört pulsotip (A,B,C,D) içerisinde gruplaştığı saptanmıştır.



## Sonuç

Ülkemizde endemik olarak bulunan OXA-48 pozitif izolatların yanında NDM enzimi taşıyan izolatların görülme sıklığının endemik düzeye ulaşmaya başladığı, ilk kez 2012 yılında belirlenen KPC pozitif suşların NDM pozitifliği kadar olmasada hızla arttığı görülmektedir. Yıllar içinde hızla artan bu yayılımın engellenebilmesi için özellikle riskli bölümlerdeki hastalara, KÜE açısından kontrol dışı tarama testlerinin yapılması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması önerilmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** *K.pneumoniae*, OXA-48, NDM, KPC, VIM, IMP, pulsed-field jel elektroforezi



## 8. ABSTRACT

### Molecular characterization of Carbapenemase producing *K.pneumoniae*

#### Introduction and purpose

This is the first study indicated that definition and incidence of transferable carbapenemase genes of carbapenem resistant *K. pneumoniae* at the University Hospital of Kocaeli. Strains collected from Kocaeli University Hospital Central Microbiology Laboratory between January 2015 and February 2017. The purpose of this study, providing epidemiologic data for both our hospital and country.

#### Materials and methods

The study was included 100 isolates of *K. pneumoniae* that detected reduced susceptibility to any of the carbapenem group antibiotics with automated system Vitek-2 (BioMérieux, France). The disc diffusion method was used to determine the AMC, TZP and SXT sensitivities. MIC values were determined by agar dilution method to determine the sensitivities of other antimicrobial agents (AMP, AK, İPM, MEM, ETP, CAZ, CTX, CIP, KOL, TG, CN). The frequencies in our hospital for *bla*<sub>OXA-48</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> genes which frequently detected in our country have been investigated by two different multiplex PCR methods. In addition, PFGE method was used to determine the carbapenem resistant *K. pneumoniae* (CRKP) strains clonal relationship isolated from our hospital.

#### Results

The highest resistance for all strains was determined against AMP (100%), AMC (100%) and TZP (100%). Although KOL resistance rate is rising, it (42%) is detected as the most sensitive antibiotic. It was determined that 95 CRKP isolates carry at least one of the carbapenemase genes. 81.05% of the genes were identified as *bla*<sub>OXA-48</sub>, 38.9% as *bla*<sub>NDM</sub>, 9.47% as *bla*<sub>KPC</sub> and 1.05% as *bla*<sub>VIM</sub>. One isolate was identified for the first time carrying the *bla*<sub>OXA-48+KPC</sub> gene and the two isolates were identified for the first time carrying the *bla*<sub>KPC+NDM</sub> gene. With PFGE, it was determined that the isolates were divided into 24 different clones, and 63.09% were grouped into four pulse types (A, B, C, D).

## Conclusion

In addition to *bla*<sub>OXA-48</sub> gene positive isolates found endemic in our country, the incidence of *bla*<sub>NDM</sub> gene-carrying isolates is beginning to reach endemic levels. Although as much as not *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> gene positive strains isolated for the first time 2012, spreading rapidly. In order to prevent this spread which is increasing rapidly over the years, it is suggested to carry out control stool screening tests and to take infection control measures especially in terms of the carbapenemase producing Enterobacteriaceae on patients in the risk areas.

**Key Words:** *K.pneumoniae*, OXA-48, NDM, KPC, VIM, IMP, pulsed-field gel electrophoresis



## 9. EKLER

### 1.EK. Epidemiyolojik hasta formu

Hasta ad-soyad:	Dosya no:
Hasta no:	Laboratuvar protokol no:
Yaş:	Cinsiyet: K <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/>
Örnek istem tarihi:	Örneğin geldiği birim:
Örnek türü:	Eş zamanlı üreyen başka mikroorganizma: <input type="checkbox"/>
Hastanın tanısı:	Hastanın geldiği yer: ev <input type="checkbox"/> hastane <input type="checkbox"/>
Hastaneye yatma: yatıyor <input type="checkbox"/> ayaktan <input type="checkbox"/>	Önceki servis/ sonraki servis:
Yatış tarihi:	Yatıyorsa enfeksiyon kaçınıcı günde gelişti:
Çıkış tarihi:	Önceki 1 ay içinde kullanılan antibiyotikler:
Ex ise üremenin kaçınıcı gününde:	Önceki 1 ay içinde karbapenem grubu antibiyotik kullanımı: <input type="checkbox"/>
Malignite: <input type="checkbox"/> immünsüpresyon: <input type="checkbox"/>	
KBY: <input type="checkbox"/> pulmoner hastalık: <input type="checkbox"/>	WBC:
DM: <input type="checkbox"/> kardiyovasküler hastalık: <input type="checkbox"/>	CRP:
HT: <input type="checkbox"/> SSS hastalığı: <input type="checkbox"/>	ATEŞ: <input type="checkbox"/>
Y.B.Ü de bulunma: <input type="checkbox"/>	İdrar sondası: <input type="checkbox"/>
	Trakeotomi <input type="checkbox"/>
	Cvp katater: <input type="checkbox"/>
	Ventilasyon tüpü: <input type="checkbox"/>

	Major cerrahi operasyon: <input type="checkbox"/>
Kültür –antibiyoqram sonrası kullanılan antibiyotik:	Tedavi süresi:



## 10. KAYNAKLAR

1. Gülay Z. *Enterobacteriaceae* moleküler epidemiyolojisi. *Ankem Derg.* 2014;73-76.
2. Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA ve ark. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2008;29:996-1011.
3. Gur D, Hascelik G, Aydin N, Telli M, Gultekin M, Ogulnc D ve ark. Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007. *J Chemother.* 2009;21:383-389.
4. [http://uamdss.thsk.gov.tr/index.php?option=com\\_phocadownload&view=category&id=6:raporlar&Itemid=13](http://uamdss.thsk.gov.tr/index.php?option=com_phocadownload&view=category&id=6:raporlar&Itemid=13)
5. [http://www.euro.who.int/data/assets/pdf\\_file/0009/323568/CAESAR-Annual-report-2016.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/data/assets/pdf_file/0009/323568/CAESAR-Annual-report-2016.pdf?ua=1)
6. Us E, Tekeli A, Arikan Akan O, Dolapci I, Sahin F, Karahan ZC. [Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated between 2004-2007 in Ankara University Hospital, Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2010;44:1-10.
7. Eser OK, Altun Uludag H, Ergin A, Boral B, Sener B, Hascelik G. [Carbapenem resistance in ESBL positive *Enterobacteriaceae* isolates causing invasive infections]. *Mikrobiyol Bul.* 2014;48:59-69.
8. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1791-1798.
9. Abbott SL, Kaleli İÇ. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* ve Diğer *Enterobacteriaceae*. Başustaoğlu A, ed. *Klinik Mikrobiyoloji*, 9.Basım. Ankara: Atlas Kitapçılık. 2009:698-715.
10. Procop GW, Church, DL., Hall GS., Janda WM., Koneman EW., Schreckenberger PC ve ark. *The Enterobacteriaceae*. *Koneman's Color Atlas and Textbook of*

Diagnostic Microbiology, 7.Basım. Philadelphia: Wolters Kluwer Health.  
2017:213-315.

11. Farmer JJ, Boatwright KK, Janda M, Aktepe OÇ. *Enterobacteriaceae*: Giriş ve Tanımlama. Başustaoglu A, ed. Klinik Mikrobiyoloji, 9.Baskı. Ankara: Atlas Kitapçılık. 2009:649-669.
12. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11:589-603.
13. <https://www.uptodate.com>. Yu WL, Chuang YC. Microbiology and pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* infection.
14. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of *Klebsiella pneumoniae*. Microbiol Spectr. 2016;4.
15. <https://www.uptodate.com>. Yu WL, Chuang YC. Clinical features, diagnosis, and treatment of *Klebsiella pneumoniae* infection.
16. [https://www.ahrq.gov/sites/default/files/publications/files\\_cretoolkit.pdf](https://www.ahrq.gov/sites/default/files/publications/files_cretoolkit.pdf). Parker VA, Logan CK, Currie B. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Control and Prevention Toolkit.
17. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect. 2014;20:821-830.
18. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ ve ark. Intestinal Carriage of Carbapenemase-Producing Organisms: Current Status of Surveillance Methods. Clin Microbiol Rev. 2016;29:1-27.
19. Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K ve ark. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. Clin Microbiol Infect. 2011;17:1798-1803.

20. Hirakata Y, Izumikawa K, Yamaguchi T, Takemura H, Tanaka H, Yoshida R ve ark. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42:2006-2011.
21. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18:306-325.
22. Han JH, Goldstein EJ, Wise J, Bilker WB, Tolomeo P, Lautenbach E. Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Network of Long-Term Acute Care Hospitals. *Clin Infect Dis.* 2017;64:839-844.
23. Guh AY, Limbago BM, Kallen AJ. Epidemiology and prevention of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in the United States. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12:565-580.
24. Ayaz C. Beta laktamların genel özellikleri ve Penisilinler. Willke Topçu A. SG, Doğanay M., ed. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Basım. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 2008:266-278.
25. Etebu E, Ariekpar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives *IJAMBR.* 2016;4:90-101.
26. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.* 2017;131:185-195.
27. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clin Microbiol Infect.* 2008;14:1102-1111.
28. Hugonnet JE, Tremblay LW, Boshoff HI, Barry CE, 3rd, Blanchard JS. Meropenem-clavulanate is effective against extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science.* 2009;323:1215-1218.
29. Joseph J, Rodvold KA. The role of carbapenems in the treatment of severe nosocomial respiratory tract infections. *Expert Opin Pharmacother.* 2008;9:561-575.



30. Vahaboğlu H. Antibiyotik direnç mekanizmaları. *Klimik Derg.* 1993;6:6-8.
31. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4943-4960.
32. Cag Y, Caskurlu H, Fan Y, Cao B, Vahaboglu H. Resistance mechanisms. *Ann Transl Med.* 2016;4:326.
33. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Resistance\\_mechanisms/EUCAST\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_v1.0\\_20131211.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf)
34. Göluy Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Betalaktamlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 2001;5:210-229.
35. Kılıç Ü, Demiray T, M A. Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Saptanmasında Fenotipik ve Genotipik Metotlar. *Ankem Derg.* 2016;30:62-75.
36. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68:487-489.
37. Budak S, Aktaş Z, H E. Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvarıdan Kliniđe Karbapenemazlar. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob.* 2012;1:1-11.
38. <https://www.uptodate.com>. Quale J, Spelman D. Overview of carbapenemase-producing gram-negative bacilli.
39. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V ve ark. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:432-438.
40. <http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>
41. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017;215:S28-S36.

42. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD ve ark. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:1151-1161.
43. Abdallah M, Olafisoye O, Cortes C, Urban C, Landman D, Ghitan M ve ark. Rise and fall of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71:2945-2948.
44. van Duin D, Perez F, Rudin SD, Cober E, Hanrahan J, Ziegler J ve ark. Surveillance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: tracking molecular epidemiology and outcomes through a regional network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:4035-4041.
45. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* working g. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. *Euro Surveill.* 2015;20.
46. Parisi SG, Bartolini A, Santacatterina E, Castellani E, Ghirardo R, Berto A ve ark. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* strains producing carbapenemases and increase of resistance to colistin in an Italian teaching hospital from January 2012 To December 2014. *BMC Infect Dis.* 2015;15:244.
47. Spyropoulou A, Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Vamvakopoulou S, Marangos M, Spiliopoulou I ve ark. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *J Med Microbiol.* 2016;65:240-246.
48. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence.* 2017;8:460-469.
49. Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D ve ark. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in

- carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:2493-2494.
50. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect.* 2014;2:50-51.
  51. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. *Pak J Pharm Sci.* 2015;28:1127-1133.
  52. Cakar A, Akyon Y, Gur D, Karatuna O, Ogunc D, Ozhak Baysan B ve ark. [Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50:21-33.
  53. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:20.
  54. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S ve ark. Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58:2929-2933.
  55. Ozbek B, Mataraci-Kara E, Er S, Ozdamar M, Yilmaz M. In vitro activities of colistin, tigecycline and tobramycin, alone or in combination, against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* strains. *J Glob Antimicrob Resist.* 2015;3:278-282.
  56. Kuskucu MA, Karakullukcu A, Ailiken M, Otlu B, Mete B, Aygun G. Investigation of carbapenem resistance and the first identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzyme among *Escherichia coli* isolates in Turkey: A prospective study. *Travel Med Infect Dis.* 2016;14:572-576.
  57. Girmenia C, Serrao A, Canichella M. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2016;8:e2016032.

58. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. Clin Microbiol Infect. 2006;12:695-696.
59. Percin D, Colakoglu S, Durmaz S, Ekincioglu P. [Comparison of ertapenem-EMB Agar with traditional methods for screening carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from rectal swabs]. Mikrobiyol Bul. 2012;46:546-552.
60. 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;78:277-281.
61. Zarakolu P, Eser OK, Aladag E, Al-Zahrani IA, Day KM, Atmaca O ve ark. Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. Diagn Microbiol Infect Dis. 2016;85:466-470.
62. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R ve ark. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43:1584-1590.
63. Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD ve ark. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. Antimicrob Agents Chemother. 2000;44:891-897.
64. Oteo J, Miro E, Perez-Vazquez M, Navarro F. Evolution of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* at the global and national level: what should be expected in the future? Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32 Suppl 4:17-23.
65. Midilli K, Aygün G, Kuşkucu M, Yaşar H, Ergin S, Altaş K. Bir *Klebsiella pneumoniae* kökeninde saptanan yeni bir metallo-beta-laktamaz varyantı: VIM-5. XI. KLİMİK Kongresi. İstanbul; 2003. p. 275.
66. Yildirim I, Ceyhan M, Gur 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;19:467-468.
67. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K ve ark. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:5046-5054.
  68. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:1274-1278.
  69. Lascols C, Hackel M, Marshall SH, Hujer AM, Bouchillon S, Badal R ve ark. Increasing prevalence and dissemination of NDM-1 metallo-beta-lactamase in India: data from the SMART study (2009). *J Antimicrob Chemother.* 2011;66:1992-1997.
  70. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:2784-2785.
  71. Alp E, Percin D, Colakoglu S, Durmaz S, Kurkcu CA, Ekincioglu P ve ark. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect.* 2013;84:178-180.
  72. Iraz M, Ozad Duzgun A, Sandalli C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A ve ark. Distribution of beta-lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015;35:595-601.
  73. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011;11:355-362.

74. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48:15-22.
75. 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.
76. Castanheira M, Mendes RE, Woosley LN, Jones RN. Trends in carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* from Europe and the Americas: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2007-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66:1409-1411.
77. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20:440-458, table of contents.
78. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty- third Informational supplement. M100-S26. Wayne, PA.; 2016.
79. CDC. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2009;58:256-260.
80. Hammoudi D, Moubareck CA, Sarkis DK. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. *J Microbiol Methods*. 2014;107:106-118.
81. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA, Dutch Working Party on the Detection of Highly Resistant M. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:205-210.
82. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC, and Brilliance CRE screening media for detection of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013;75:214-217.

83. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2012;18:1503-1507.
84. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015;10:e0123690.
85. Hrabak J, Chudackova E, Walkova R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:103-114.
86. Glupczynski Y, Evrard S, Ote I, Mertens P, Huang TD, Leclipteux T ve ark. Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71:1217-1222.
87. Avlami A, Bekris S, Ganteris G, Kraniotaki E, Malamou-Lada E, Orfanidou M ve ark. Detection of metallo-beta-lactamase genes in clinical specimens by a commercial multiplex PCR system. *J Microbiol Methods*. 2010;83:185-187.
88. Stuart JC, Voets G, Scharringa J, Fluit AC, Leverstein-Van Hall MA. Detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with a commercial DNA microarray. *J Med Microbiol*. 2012;61:809-812.
89. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother*. 2012;67:1865-1869.
90. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH ve ark. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol*. 1995;33:2233-2239.

91. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: a review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol.* 2010;10:866-875.
92. Procop GW, Church, DL., Hall GS., Janda WM., Koneman EW., Schreckenberger PC ve ark. *Molecular Microbiology. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Seventh edition.* Philadelphia: Wolters Kluwer Health. 2017:137-172.
93. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 1997;18:426-439.
94. Basım E, Basım H. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) technique and its use in Molecular Biology. *Turk J Biol.* 2001;25:405-418.
95. <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/cre/cre-guidance-508.pdf>
96. Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control.* 2008;36:309-332.
97. MİK Saptama Yöntemleri. Akbaş E, ed. *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi, 1.0.* Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San ve Tic Ltd Şti. 2014:14-19.
98. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi. Akbaş E, ed. *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi.* Ankara: Aydoğdu Ofset Matbaacılık Ambalaj San ve Tic Ltd Şti. 2014:11-18.
99. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_6.0\\_Breakpoint\\_table.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf)
100. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2011;70:119-123.



101. Steinbrueckner B, Haerter G, Pelz K, Kist M. Routine identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from human stool samples. FEMS Microbiol Lett. 1999;179:227-232.
102. <https://www.cdc.gov/pulsenet/pdf/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>
103. [http://tmc-online.org/images/37\\_kongre/Onur\\_KARATUNA.pdf](http://tmc-online.org/images/37_kongre/Onur_KARATUNA.pdf)
104. <http://www.klimik.org.tr/wp-content/uploads/2017/05/Ulusal-Antimikrobiyal-Diren%C3%A7-S%C3%BCrveyans-UAMDS-Verileri-H%C3%BCsniye-%C5%9Eim%C5%9Fek.pdf>
105. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decre D, Arlet G ve ark. Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. J Clin Microbiol. 2012;50:1295-1302.
106. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. Open Forum Infect Dis. 2015;2:ofv050.
107. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasevic AT ve ark. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. Lancet Infect Dis. 2017;17:153-163.
108. Tamma PD, Cosgrove SE, Maragakis LL. Combination therapy for treatment of infections with gram-negative bacteria. Clin Microbiol Rev. 2012;25:450-470.
109. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. Expert Opin Pharmacother. 2014;15:1351-1370.
110. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. J Intern Med. 2015;277:501-512.

111. Pournaras S, Vriioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A ve ark. Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time-kill assay. Int J Antimicrob Agents. 2011;37:244-247.
112. Qureshi ZA, Paterson DL, Potoski BA, Kilayko MC, Sandovsky G, Sordillo E ve ark. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:2108-2113.
113. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. J Antimicrob Chemother. 2010;65:1119-1125.
114. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Treccarichi EM, Tumietto F, Marchese A ve ark. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing K. pneumoniae: importance of combination therapy. Clin Infect Dis. 2012;55:943-950.
115. Oliva A, Mascellino MT, Cipolla A, D'Abramo A, De Rosa A, Savinelli S ve ark. Therapeutic strategy for pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* severe infections: short-course treatment with colistin increases the in vivo and in vitro activity of double carbapenem regimen. Int J Infect Dis. 2015;33:132-134.
116. Yahav D, Lador A, Paul M, Leibovici L. Efficacy and safety of tigecycline: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2011;66:1963-1971.
117. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, Schwartz D, Leavitt A, Carmeli Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1028-1033.

118. Wang Q, Zhang Y, Yao X, Xian H, Liu Y, Li H ve ark. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35:1679-1689.
119. Patel G, Huprikar S, Factor SH, Jenkins SG, Calfee DP. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008;29:1099-1106.
120. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16:18.
121. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J ve ark. Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA*. 2015;314:1479-1487.
122. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, Oren I, Kassis I, Finkelstein R. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:666-671.
123. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011;53:60-67.
124. Kochar S, Sheard T, Sharma R, Hui A, Tolentino E, Allen G ve ark. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009;30:447-452.
125. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, Kopuit P, Schlesinger Y, Broide E ve ark. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect*. 2010;74:344-349.
126. Gould CV, Umscheid CA, Agarwal RK, Kuntz G, Pegues DA, Healthcare Infection Control Practices Advisory C. Guideline for prevention of catheter-associated urinary tract infections 2009. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010;31:319-326.

127. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:2950-2954.
128. Azap O, Otlu B, Yesilkaya A, Yakupogullari Y. Detection of OXA-48-like Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology. *Balkan Med J.* 2013;30:259-260.
129. Cizmeci Z, Aktas E, Otlu B, Acikgoz O, Ordekci S. Molecular characterization of carbapenem- resistant *Enterobacteriaceae* yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48- endemic area. *J Chemother.* 2017;1-7.
130. Berrazeg M, Diene S, Medjahed L, Parola P, Drissi M, Raoult D ve ark. New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps. *Euro Surveill.* 2014;19.
131. Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R ve ark. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:597-602.
132. Livermore DM, Walsh TR, Toleman M, Woodford N. Balkan NDM-1: escape or transplant? *Lancet Infect Dis.* 2011;11:164.
133. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M ve ark. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13:785-796.
134. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62:1257-1260.

135. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S ve ark. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill.* 2012;17.
136. Giani T, Pini B, Arena F, Conte V, Bracco S, Migliavacca R ve ark. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. *Euro Surveill.* 2013;18.
137. Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:395-397.
138. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece--a review of the current evidence. *Euro Surveill.* 2008;13.
139. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S ve ark. VIM-1 Metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. *J Clin Microbiol.* 2003;41:3893-3896.
140. Daikos GL, Karabinis A, Paramythiotou E, Syriopoulou VP, Kosmidis C, Avlami A ve ark. VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: analysis of 28 cases. *Int J Antimicrob Agents.* 2007;29:471-473.
141. Sedighi M, Halajzadeh M, Ramazanzadeh R, Amirmozafari N, Heidary M, Pirouzi S. Molecular detection of beta-lactamase and integron genes in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* by multiplex polymerase chain reaction. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50:321-328.
142. Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M ve ark. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18:413-431.
143. Perilli M, Bottoni C, Grimaldi A, Segatore B, Celenza G, Mariani M ve ark. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;75:218-221.

144. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L ve ark. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathog.* 2012;4:7.
145. Chen Z, Wang Y, Tian L, Zhu X, Li L, Zhang B ve ark. First report in China of *Enterobacteriaceae* clinical isolates coharboring blaNDM-1 and blaIMP-4 drug resistance genes. *Microb Drug Resist.* 2015;21:167-170.
146. Liu Y, Wan LG, Deng Q, Cao XW, Yu Y, Xu QF. First description of NDM-1-, KPC-2-, VIM-2- and IMP-4-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a single Chinese teaching hospital. *Epidemiol Infect.* 2015;143:376-384.
147. Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;44:260-262.
148. Pereira PS, Borghi M, Albano RM, Lopes JC, Silveira MC, Marques EA ve ark. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microb Drug Resist.* 2015;21:234-236.
149. Barguigua A, El Otmani F, Lakbakbi El Yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K, Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco. *APMIS.* 2013;121:675-677.
150. Kilic A, Baysallar M. The First *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med.* 2015;35:382-383.
151. Karabay O, Altindis M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir OA, Erdem AF. The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2016;15:6.

152. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012;25:682-707.
153. Cetinkol Y, Yildirim AA, Telli M, Calgin MK. The investigation of oxacillinase/metallo-beta-lactamase genes and clonal analysis in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Infez Med.* 2016;24:48-53.
154. Chen S, Feng W, Chen J, Liao W, He N, Wang Q ve ark. Spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a southwest hospital in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2014;13:42.
155. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici De Angelis L ve ark. Large Nosocomial Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Traced to Clonal Expansion of an mgrB Deletion Mutant. *J Clin Microbiol.* 2015;53:3341-3344.
156. Khatri A, Naeger Murphy N, Wiest P, Osborn M, Garber K, Hecker M ve ark. Community-Acquired Pyelonephritis in Pregnancy Caused by KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4375-4378.
157. Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R ve ark. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*, Senegal. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:143-144.