

T.C
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBAPENEMAZ ÜRETEN *KLEBSIELLA SPP.* SUŞLARINDA OXA-48-
LIKE GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elmas Pınar KAHRAMAN

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ

T.C

SAKARYA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KARBAPENEMAZ ÜRETEN *KLEBSIELLA SPP.* SUŞLARINDA OXA-48-LIKE
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

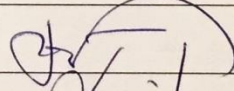
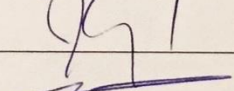

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Elmas Pınar KAHRAMAN

Enstitü Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Enstitü Bilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji

Bu tez 04/092018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/ oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ ÜYESİ	KANAATI	İMZA
Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ	Başarılı	
Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU	Başarılı	
Prof. Dr. Riça DURMAZ	BAŞARILI	

BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 31.10.2016 tarihinde 174 karar numarası ile onay alınmıştır. Çalışma için gerekli bütçe Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü (BAP) tarafından karşılanmıştır. Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilemeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Elmas Pınar KAHRAMAN

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca benden bilgi birikimini, rehberliğini esirgemeyen, önerileriyle beni yönlendiren, her konuda yol gösterici olan tez danışmanım sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'ye teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca laboratuvar teknik desteklerinden dolayı Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU hocama, Arő. Gör. Dr. Hande Toptan'a, başta Gülőah KESKİNKILIÇ ve Enes GÜVEN olmak üzere tüm teknisyen arkadaşlarıma ve değerli hocalarıma Őükranlarımı sunarım.

Hem eğitim hayatımda hem sosyal yaőantımda her daim yanımda olan, yardımına yetişen, hoşgörüsünü bana sunmakta cömert olan değerli arkadaşım İmdat KILBAŐ'a çok teşekkür ederim.

Yetiőmemde emeği geçen, her zaman yanımda olan, ailem, destekçilerim, ilk öğretmenlerim olan canım annem ve rahmetli babama teşekkür, minnet ve sevgilerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	i
TEŞEKKÜR	ii
KISALTMA VE SİMGELER.....	v
TABLolar	vii
ŞEKİLLER	viii
ÖZET	ix
SUMMARY	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. GENEL AMAÇ	2
1.2. ÖZEL AMAÇLAR	2
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. ENTEROBACTERİACEAE AİLESİ, Klebsiella spp.	3
2.1.1. Taksonomi.....	3
2.1.2. Klebsiella Türlerinin Virülans Faktörleri.....	4
2.1.2.1. Kapsül	4
2.1.2.2. Pili	5
2.1.2.3. Serum Direnci ve Lipopolisakkarit	5
2.1.2.4. Sideroforlar	6
2.1.3. Epidemiyoloji.....	6
2.1.4. Yaptığı Enfeksiyonlar	9
2.1.5. Karbapenemaz Üreten Klebsiella Enfeksiyonlarının Tedavisi	10
2.1.6. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. ARAŞTIRMANIN AMACI.....	13
3.1.1. Araştırmanın Hedefleri	14
3.2. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE TARİH	14
3.3. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ	14
3.4. SUŞLARIN TOPLANMASI VE BAKTERİLERİN İZOLASYONU	14
3.5. İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOGRAF ÇALIŞMALARI	15
3.5.1. İdentifikasyon	15
3.5.2. Antibiyogram	16

3.5.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu	17
3.6. KARBAPENEM DİRENCİNİN DOĞRULANMASI	18
3.6.1. Disk Difüzyon Testi	18
3.6.2. Modifiye Hodge Testi	19
3.7. GENOTİPİK TESTLER	20
3.7.1. Nükleik Asit İzolasyonu.....	20
3.7.1.1. Real Time PCR	20
3.7.1.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRMA) ve Dizileme	21
3.8. SONUÇLARIN ANALİZİ.....	24
4. BULGULAR.....	26
4.1. SUŞLARIN SOYUTLANDIĞI HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN BULGULAR	26
4.2. SUŞLARIN İZOLE EDİLDİĞİ KLİNİK ÖRNEK TÜRLERİNE ve GELDİĞİ KLİNİKLERE İLİŞKİN BULGULAR.....	26
4.3. MİK DEĞERLERİNE İLİŞKİN BULGULAR	27
4.4. PCR SONUÇLARINA İLİŞKİN BULGULAR	30
4.5. HRMA SONUÇLARINA İLİŞKİN BULGULAR.....	33
4.6. SANGER SEKANS YÖNTEMİNE AİT BULGULAR	34
5. TARTIŞMA.....	37
KAYNAKLAR	46
EKLER	63
ÖZGEÇMİŞ.....	64

KISALTMA VE SİMGELER

<i>K.pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
MDR	: Multi Drug Resistance
GSBL	: Geniş Spektrumlu β -Laktamaz
NDM	: New Delhi metallo- β -Laktamaz
MBL	: Metallo- β -Laktamaz
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
IMP	: İmipenemase
OXA	: Oxacilinase
HRMA	: High Resolution Melting Analysis
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
<i>S. marcescens</i>	: <i>Serratia marcescens</i>
<i>K. ozaenae</i>	: <i>Klebsiella ozaenae</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	: <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>
<i>K. terrigena</i>	: <i>Klebsiella terrigena</i>
<i>K. ornithinolytica</i>	: <i>Klebsiella ornithinolytica</i>
<i>K. planticola</i>	: <i>Klebsiella planticola</i>
<i>K. trevisanii</i>	: <i>Klebsiella trevisanii</i>
<i>K. aerogenes</i>	: <i>Klebsiella aerogenes</i>
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
LPS	: Lipopolisakkarit
C5	: Complement 5
C9	: Complement 9
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
PBP	: Penisilin Bağlanma Proteini
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility

Testing

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

EMB : Eosin Metilen Blue

μ l : Mikrolitre

ml : Mililitre

MHB : Mueller Hinton Broth

MHA : Mueller Hinton Agar

MHT : Modifiye Hodge Test

qPCR : Quantitative Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA : Deoksiribo Nükleik Asit

F : Forward

R : Reverse

CT : Cycle Thresold

SNP : Single Nucleotide Polimorphism

WGS : Whole Genome Sequencing

β : Beta

TABLolar

Tablo 3.7.1. PCR koşulları.....	21
Tablo 3.7.2. HRM parametreleri ve PCR koşulları.....	23
Tablo 4.1.1. Suşların izole edildiği hastaların cinsiyet dağılımları.....	26
Tablo 4.2.1. İzolatların klinik örneklere göre dağılımları.....	27
Tablo 4.2.2. Suşların kliniklere göre dağılımları.....	27
Tablo 4.3.2. Karbapenem Grubu Antibiyotiklerin <i>Enterobacteriaceae</i> EUCAST Sınır Değerleri.....	29
Tablo 4.3.3. Sıvı mikrodilüsyon ve otomatize sistemde bulunan duyarlılık/direnç durumlarının karşılaştırılması.....	29
Tablo 4.4.1. OXA-48 pozitifliği saptanan suşların MİK ve CT değerleri.....	31
Tablo 4.6.1. Sanger sekans sonucu elde edilen baz dizileri.....	35

ŞEKİLLER

Şekil 2.1.1. Klebsiella türlerinde virülans faktörleri.....	6
Şekil 3.5.1. <i>Klebsiella spp.</i> 'nin EMB besiyerinde görünümü.....	16
Şekil 3.5.2. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematize edilmiş görüntüsü.....	18
Şekil 3.6.1. Modifiye Hodge Testi yonca yaprağı görünümü.....	20
Şekil 3.7.1. OXA-48 gen bölgesi ve varyantları arasındaki nükleotid farklılıkları, kullandığımız primer ve prob dizilimleri.....	24
Şekil 4.3.1. Sıvı mikrodilüsyon testinin mikropate üzerindeki görünümü.....	29
Şekil 4.4.1. PCR sonuçlarına ait grafik.....	30
Şekil 4.5.1. HRMA sonucunda elde edilen grafik.....	33
Şekil 4.5.2. OXA-181 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri.....	33
Şekil 4.5.3. OXA-244 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri.....	34
Şekil 4.5.4. OXA-48 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri.....	34
Şekil 4.6.1. OXA-181 gen bölgesine ait forward dizilimin elektroferogram görüntüsü.....	36
Şekil 5.1. OXA-48 varyantları arasındaki homolojileri gösteren dendogram.....	43

ÖZET

GİRİŞ VE AMAÇ: Son yıllarda karbapeneme dirençli Enterobacteriaceae izolatlarının dünya genelinde giderek arttığı bilinmektedir. Bu çalışmanın amacı, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerini tespit etmektir.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamız için kullanılan izolatlar, SEAH Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan alınmıştır. İdentifikasyon ve antibiyotik duyarlılık analizleri VITEK 2 otomatize sistemi ile değerlendirilmiştir. Karbapeneme dirençli olan izolatların karbapenemaz üretimleri Modifiye Hodge Testi ile saptanmıştır. Her bir suşa ait MİK (Minimum İnhibitör Konsantrasyonu) değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra bu izolatlardan, Real time PCR (qPCR) yöntemi ile OXA-48 gen bölgesini içerenler tespit edilmiştir. Sonrasında High Resolution Melting Analysis (HRMA) yöntemi ile OXA-48 varyantları olduğundan şüphelenilen suşlar hangi varyant olduğunu tespit etmek için Sanger dizi analizi yöntemi ile irdelenmiştir.

BULGULAR: Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında imipenem için VITEK 2 ve mikrodilüsyon yöntemi arasında %82, meropenem için %77, ertapenem için %90 uyum saptanmıştır. qPCR yöntemi ile 100 *K. pneumoniae* suşunun 45 tanesinde OXA-48 gen bölgesi pozitif olarak tespit edilmiştir. OXA-48 varyantlarını belirlemek için PCR ile pozitif bulunan 45 suş HRMA metodu ile yorumlanmıştır. Sonrasında dizi analizi ile 41 suşun OXA-48/OXA-245 gen bölgelerini içerdiği, 2 suşun OXA-181 ve 2 suşun da OXA-244 gen bölgelerini içerdiği tespit edilmiştir.

SONUÇ: Çalışmamız sonucunda OXA-48 pozitifliği %45 olarak bulunmuştur. Bu suşların da %4.4'ünün OXA-181, %4.4'ünün de OXA-244 bölgelerini içerdiği bulunmuştur. Ülkemizde OXA-48 varyantlarının geniş kapsamlı olarak irdelendiği ilk çalışma olması, epidemiyolojik çalışmalara katkı sağlaması, karbapenemaz tespiti ile ilgili yerli tanı kitlerinin yapımına zemin oluşturması, kliniklere doğru ve etkin sonuçların iletilmesi nedeniyle çalışmamız önem arz etmektedir.

Anahtar Sözcükler: OXA-48 benzeri gen bölgesi, karbapenemaz, *Klebsiella pneumoniae*, high resolution melting analysis, tek nükleotid polimorfizmi

SUMMARY

Investigation of OXA-48-like Genes in Carbapenemase Producing *Klebsiella* spp. Strains

INTRODUCTION AND OBJECTIVE: In recent years, increase of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* isolates is known worldwide. The aim of this study is to identify OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163 and OXA-245 gene regions in OXA-48 like carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* isolates.

MATERIALS AND METHODS: The isolates used for our study were taken from SEAH Medical Microbiology Laboratory collection. Identification and antibiotic susceptibility analyzes were evaluated with the VITEK 2 automated system. Carbapenemase production isolates was determined by the Modified Hodge Test. The MIC values of each isolates were determined by broth microdilution method. Afterwards in these isolates, and isolates containing the OXA-48 gene region were identified by qPCR. The strains suspected of owning OXA-48 variants by HRMA method were sequencing to determine which variants were present.

RESULTS: In carbapenemase producing *K. pneumoniae* strains, categorical agreement for VITEK 2 and microdilution were obtained for imipenem, meropenem and ertapenem, 82%, 77%, and 90% respectively. By qPCR method, OXA-48 gene locus was found to be positive in 45 of 100 *K. pneumoniae* strains. To identify OXA-48 variants, 45 strains that were positive by PCR were interpreted by HRMA method. Afterwars, Sanger sequencing revealed that 41 strains contained OXA-48/OXA-245 gene regions, 2 strains OXA-181 and 2 strains determined OXA-244 gene regions.

CONCLUSION:As a result of our study, OXA-48 positivity was found to be 45%. These strains 4.4% were found to contain OXA-181 and 4.4% were found to contain OXA-244 regions. It is important that we study because OXA-48 variants in our country are the first to be comprehensively studied, epidemiological studies because of contribution, provide a basis for the establishment of indigenous diagnostic kits for carbapenemase detection, which saves time in the laboratory and improves clinical outcomes.

Keywords: OXA-48 like gene locus, carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, high resolution melting analysis, single nucleotide polymorphism

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çok ilaca dirençli (MDR), geniş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ailesi üyesi bakterilerin ortaya çıkışı ve yayılması dünya çapında bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Ayrıca halihazırda kullanılmakta olan antibiyotiklerin etkinliklerine karşı büyük bir tehdit oluşturmaktadırlar (Zarrilli et al 2009, Nordmann, Naas and Poirel 2011, Brink et al 2012b, Marchaim et al 2012, Bush 2013a).

Karbapeneme dirençli bakteriler, MDR Gram negatif bakterilerin neden olduğu hayatı tehdit eden enfeksiyonlara karşı son seçenek olarak kullanılan geniş spektrumlu β -laktam antibiyotikler olan karbapenemlerin kullanımını kısıtlamaktadırlar (El Gamal and Oh 2010, Patel and Bonomo 2013). Gram-negatif bakteriler arasında karbapenemazların (karbapenem hidrolize edici enzimlerin) ortaya çıkması hem toplum hem de hastane ortamı için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır (Patel and Bonomo 2013). Karbapenemaz moleküler ailesi, NDM (New Delhi metallo- β -laktamaz), VIM (Verona-integron mediated metallo- β -laktamaz) ve IMP (imipenemaz) gibi metalo- β -laktamazlar (MBL'ler) ve serin karbapenemazlardan (KPC "*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase" ve OXA tipi karbapenemazlardan) oluşur (Walsh 2010, Bush 2013a).

Karbapenemaz üreten izolatların neden olduğu enfeksiyonlar gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde karbapenem direncine KPC, NDM gen bölgelerine sporadik, OXA-48 gen bölgesine ise endemik olarak rastlanmaktadır (Nordmann and Poirel 2014). OXA-48 enzimlerinin plazmid aracılığı ile aktarılması bakteriler arasında direncin hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır (Nazik, Poirel ve Nordmann 2005). Karbapenemlere karşı gittikçe artmakta olan direnç için bakterilerde taramalar yapılması gerekmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda daha çok OXA-48 gen bölgeleri ile VIM, KPC, NDM, OXA-48, IMP gen bölgeleri birliktelikleri araştırılmıştır. Fakat hastanemiz dahil birçok bölgede, karbapeneme dirençli olup bu gen bölgelerinin hiç birinin bulunmadığı suşlara rastlanmaktadır. OXA-48 varyantlarının araştırılması bu noktada gerekmektedir. OXA-48 benzeri gen bölgelerinden bazılarının araştırıldığı çalışmalar az sayıda mevcut olmak ile birlikte,

ülkemizde OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerinin tümünü araştıran bir çalışma mevcut değildir.

OXA-48 varyantlarından OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 bölgelerinin tümünün karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında araştırılması ilk defa bu çalışmada yapılmıştır. Ülkemizin OXA-48 tipi karbapenemazların başta Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ile birlikte en önemli rezervuarını oluşturan bölgeler arasında olması nedeniyle bu gen bölgelerinin ülkemizdeki suşlarda irdelenmesi gerekmektedir. Çalışmamız, OXA-48 varyantlarının tespiti ile karbapenemaz üreten suşların direnç nedenlerinin genotipik olarak aydınlatılması amacıyla planlandı. Ayrıca çalışmamız antibiyotik kombinasyon tedavilerinin yeniden gözden geçirilmesini, antibiyotik direnç nedenlerinin irdelenmesi nedeniyle klinik tedavi protokollerine katkı sağlayacaktır.

1.1. GENEL AMAÇ

Tez çalışmamızın genel amacı *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerini tespit etmektir.

1.2. ÖZEL AMAÇLAR

- Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile *K. pneumoniae* suşlarının karbapenem grubu ilaçlara karşı MİK değerlerini ölçmek,
- Modifiye Hodge Yöntemi ile *K. pneumoniae* suşlarında karbapenemaz üretimini tespit etmek,
- Real time PCR yöntemi ile OXA-48 gen bölgesini içeren izolatları tespit etmek,
- High Resolution Melting Analysis (HRMA) yöntemi ile OXA-48 varyantlarını saptamak ve
- Sanger dizi analizi ile suşların OXA-48 benzeri hangi gen bölgelerini içerdini belirlemektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENTEROBACTERIACEAE AİLESİ, *Klebsiella* spp.

2.1.1. Taksonomi

Enterobacteriaceae ailesi bazı türler (*Salmonella*, *Shigella*) hariç bağırsak florası üyelerini içerir. Bunlar; Gram negatif, peritriş flagellalı yada hareketsiz, fakültatif anaerobik, basit beslenme gereksinimleri olan düz basillerdir (Nordmann et al 2011, Lynch, Clark and Zhanel 2013). Proteobacteria filumu Gammaproteobacteria sınıfı ile ilişkili olan ailelerden sadece *Enterobacteriaceae* ailesi 51 adet cinse sahiptir (Octavia and Lan 2014). Temsilci türler; *E. coli*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens* ve *Proteus* spp. 'dir (Prescott, Harley and Klein 2008, Lynch et al 2013).

Başlangıçta, *Klebsiella* cinsi sebep oldukları hastalıklara göre üç türe ayrılmıştır. Bunlar; *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis*'tir. Taksonomi, yeni yöntemlerin geliştirilmesi nedeniyle gittikçe rafine hale geldiğinden, bu cins sınıflandırması sürekli olarak revize edilmiştir. 1980'lerin başında, daha önce "Klebsiella benzeri organizmalar" olarak sınıflandırılan ortamdan *Klebsiella* izolatları geçici takson altında yer almıştır (Gavini et al 1977). Bu gruptan dört yeni tür ortaya çıkmıştır: *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola* ve *K. trevisanii*. 1986'da, son iki tür, kapsamlı DNA sekansı homolojisi nedeniyle bir tür, *K. planticola*'ya birleştirilmiştir (Izard et al 1981, Sakazaki, Tamura, Kosako, Yoshizaki et al 1989, Bagley, Seidler and Brenner 1981, Ferragut et al 1983). Başlangıçta klinik önemi olmadığı, su, bitki ve toprak ile sınırlı olduğu düşünülürken, *K. terrigena* ve *K. planticola*'nın insan klinik örneklerinde bulunduğu bildirilmiştir (Mori et al 1989, Podschun and Ullmann 1992, Westbrook, O'Hara, Roman and Miller 2000). Bu bulgulara göre, *Klebsiella* türleri klinik izolatlardan, özellikle *K. planticola* insan enfeksiyonlarından şaşırtıcı derecede yüksek bir sıklıkla (%3.5-%18.5) izole edilmiştir. İzolatların çoğu polimikrobik örneklerden elde edildiği için, bu suşların hastalık etkeni olarak önemini tahmin etmek zor olmuştur. Bununla birlikte, 94 izolattan 6'sı monomikrobiyal örneklerden alınmış ve ilgili enfeksiyonlarla eşleştirilebilmiştir. Bu nedenle günümüzde, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca*'ya ek olarak, insan enfeksiyonlarına neden olan üçüncü bir *Klebsiella* türü de mevcut gibi

görülmektedir. Sürekli bir terminolojinin benimsenmesi, Birleşik Krallık'ın Cowan'ın sınıflandırmasına uyması ve Birleşik Devletler'in Ørskov'un sınıflandırmasını tercih etmeleri nedeniyle daha da karmaşık hale gelmiştir. Sonuç olarak, aynı bakteriye bir ülkede *K. pneumoniae*, diğerinde *K. aerogenes* denilebilmektedir. Çoğu Avrupa ülkesi de Ørskov'un dünya çapında sınıflandırmasını kabul etmektedir.

Klebsiella türleri genellikle biyokimyasal reaksiyonlarına göre tanımlanmaktadırlar. *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan Gram negatif, hareketsiz, genellikle kapsüllü basıl şeklindeki bakterilerdir. Voges-Proskauer testi pozitif olan ve lizin dekarboksilaz üreten ama ornitin dekarboksilaz üretemeyen cinsler olarak tanımlanmaktadırlar (Edwards and Ewing 1986). Çoğu Klebsiella türü, standart mikrobiyolojik laboratuvar testleri ile tespit edilebilirken, *K. terrigena* ve *K. planticola* türleri spesifik ve konvansiyonel olmayan reaksiyonlar ile tanımlanabilmektedirler (m-hidroksibenzoat veya hidroksi-L-prolin kullanımı, pektat degradasyonu, melezitozdan asit üretme veya 10°C'de üreme gibi) (Podschun and Ullman 1998). Bu türler 2001 yılında *Raoultella ornithinolytica* ve *Raoultella terrigena* olarak yeniden sınıflandırılmıştır (Drancourt, Bollet, Carta and Rousselier 2001).

2.1.2. Klebsiella Türlerinin Virülans Faktörleri

"Virülans" terimi, herhangi bir bakteri türünün patojenite ölçümünü veya derecesini tanımlar. Klebsiella türlerinde görülen virülans faktörleri Şekil 2.1.1'de özetlenmiştir. Sağlık bakımı ile ilişkili Klebsiella enfeksiyonları genellikle idrar ve solunum yollarında görülür. Bu iki vücut sahası, konak savunması mekanizmalarına göre önemli ölçüde farklı olduğu için, idrar yolu enfeksiyonu (İYE) kaynaklı Klebsiella suşlarında bulunan virülans faktörlerinin pnömoni kaynaklı suşlardan izole edilen türlerden farklı olması beklenmektedir.

2.1.2.1. Kapsül

Klebsiella türleri genellikle önemli kompleks asidik polisakkaritlerden oluşan kapsül oluşturabilme özelliğine sahiptir. Kapsüller yinelenen altbirimler, 4-6 şekerden ve sıklıkla üronik asitlerden oluşur ve 77 serolojik tipte sınıflandırılabilirler (Ørskov and Ørskov 1984). Kapsül, çoklu katmanlar halinde bakteri yüzeyini kaplayan fibrillöz

yapıların kalın demetlerinden oluşmaktadır (Amako et al 1988). Bu sayede bakteri bir yandan konağa ait polimorfonükleer granülositlerin fagositozundan korunur, diğer yandan bakterisidal serum faktörleri tarafından bakterinin öldürülmesi önlenir (Williams, Lambert, Brown and Jones 1983, Simoons-Smit, Verweij-van Vught, Kanis and MacLaren 1985, Simoons-Smit, Verweij-van Vught, Kanis and MacLaren 1986, Podschun, Penner and Ullmann 1992b, Podschun and Ullmann 1992c).

2.1.2.2. Pili

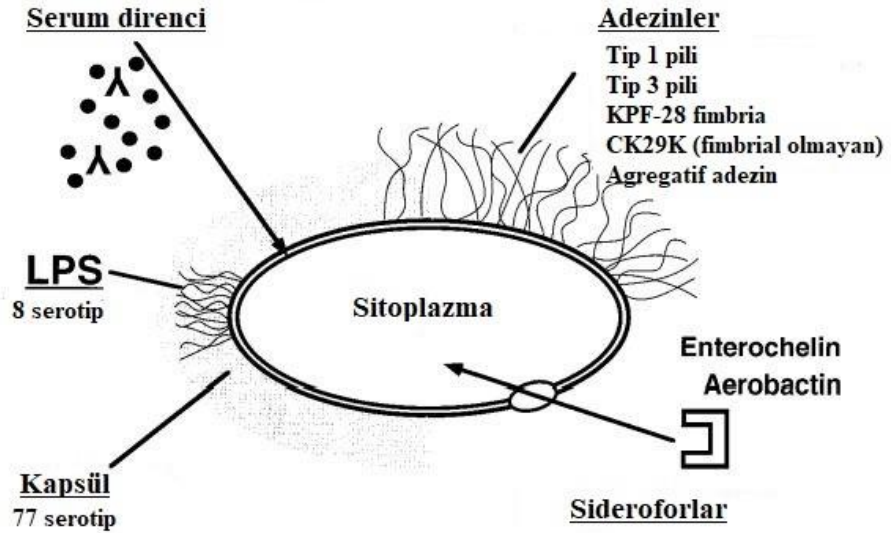
Enfeksiyon sürecinde kritik bir ilk adım olarak mikroorganizmalar mukozal yüzeylerde barınabilmek için konak hücreye mümkün olduğunca yakın olmalı ve konak hücreye yapışarak bu yakınlığı korumalıdır. *Enterobacteriaceae*'deki adherens özellikleri farklı türlerde pili aracılığı ile sağlanır. Pili bakteri yüzeyinde sarkık olmayan filamentöz çıkıntılardır. Bu yapılar 10 µm kadar uzunluğa ve 1 ila 11 nm arasında bir çapa sahiptir. Pililer, 15 ila 26 kDa moleküler kütlesi olan polimerik globüler protein alt birimlerini (pilin) içerir (Jones and Isaacson 1983, Ofek and Doyle 1994).

2.1.2.3. Serum Direnci ve Lipopolisakkarit

Bakterilerde serum direncinin altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır. Serum direncine TraT lipoproteini ya da porinler gibi dış membrandaki çeşitli proteinlerin yanında, başlıca CPS ve O antijenleri (lipopolisakkaritler (LPS)) dahil edilmiştir (Ciurana and Toma's 1987, Opal, Cross and Gemski 1982). *Klebsiella* için iki hipotez öne sürülmüştür (Merino, Camprubí, Albertí, Benedí and Toma's 1992). Birincisi, kapsül polisakaridleri alttaki LPS'yi kaplayabilir, maskeleyebilir ve komplemanı aktive etmeyen bir yüzey yapısını sergileyebilir. Öte yandan, LPS'nin O yan zincirleri kapsül katmanından geçebilir ve bazı *Klebsiella* kapsül türlerinde dış ortama maruz kalabilir (Toma's, Camprub and Williams 1988). LPS genellikle konaktaki kompleman sistemini aktive edebildiğinden, C3b daha sonra LPS molekülleri üzerine çöker. Bununla birlikte, tercihen en uzun O-polisakkarit yan zincirlerine sabitlendiğinden, C3b bakteri hücre zarından çok uzaktadır. Böylece, konakta litik membran atak kompleksinin (C5b-C9) oluşumu önlenir ve müteakiben membran hasarı ve hücre ölümü gerçekleşmez.

2.1.2.4. Sideroforlar

Konak dokuda bakterilerin gelişimi sadece konak savunma mekanizmaları ile değil aynı zamanda mevcut demir tedarikiyle de sınırlıdır. Demir, bakteri üremesinde önemli bir rol oynar, oksijen ve elektron taşıma süreçlerine katılan proteinlerde esas olarak bir redoks katalizörü olarak işlev görür (Griffiths 1987). Konak dokuda bakterilerin kullanabileceği serbest demir tedarik edilmesi olasılığı son derece düşüktür çünkü bu element hücre içi olarak hemoglobin, ferritin, hemosiderin ve miyogloblin gibi proteinlere ve ekstraselüler olarak laktoferrin ve transferrin gibi yüksek afiniteli demir bağlayıcı proteinlere bağlıdır. Serbest biyolojik olarak ulaşılabilir demir seviyesi, normal olarak bakterinin üremesi için ihtiyaç duyduğundan birkaç bin kat daha düşüktür (Bullen, Rogers and Griffiths 1978). Klebsiella için konak vücudundaki demir kaynağının, enfeksiyonların patogenezi üzerindeki belirgin etkisi gösterilmiştir. Bir guinea domuz modelinde demirin parenteral yoldan verilmesinden sonra, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarına duyarlılık dramatik bir şekilde artmıştır (Khimji and Miles 1978).



Şekil 2.1.1: Klebsiella türlerinde virülans faktörleri (Podschun and Ullmann 1998)

2.1.3. Epidemiyoloji

Klebsiella spp. doğada her yerde bulunur. Klebsiella türü bakterilerin muhtemel olarak iki ortak yaşam alanı vardır, biri çevrede yüzey suyu, kanalizasyon, toprak ve bitkiler, diğeri ise insan, at ya da domuz gibi memelilerin mukozal yüzeyleridir

(Amadi1, Peterson, Matthew-Belmar, Sharma and Hariharan 2015). İnsanlarda, *K. pneumoniae*, nazofarenks ve bağırsaklarda normal flora üyesi olarak bulunur. Taşıyıcılık oranları, çalışmadan çalışmaya önemli ölçüde farklılıklar gösterir. Dışkı örneklerinde saptanma oranı %5 ile %38 arasında değişirken, nazofarinkteki oran %1 ile %6 aralığındadır (Davis and Matsen 1974). Çünkü Gram negatif bakteriler insan derisinde uygun üreme koşulları bulamazlar ve deri florasının geçici üyeleri olarak görülürler (Rosebury 1962, Grice and Segre 2011). Bu taşıyıcılık oranları hastane ortamında, hastanede kalış süresine göre belirgin oranlarda farklılıklar göstermektedir. Klebsiella taşıyıcılık oranları hastane personelleri ile de artmaktadır (Broberg, Palacios and Miller 2014). Klebsiella suşlarının yüksek kolonizasyon oranları hastanede verilen hizmete bağlı faktörlerden ziyade antibiyotik kullanımı ile ilişkili görünmektedir. Özellikle geniş spektrumlu veya kombinasyon şeklinde antibiyotik kullanım öyküsü olan kişilerde Klebsiella ile kolonizasyon oranlarının iki ila dört kat arttığı gözlemlenmiştir. Dolayısıyla, hastanelerde MDR Klebsiella suşlarının yayılımından antimikrobiyal terapilerin yaygın kullanımı sorumlu tutulmaktadır. (Pollack et al 1972).

İstatistiklere göre, *Klebsiella spp.* endemik hastane enfeksiyonlarının %8'ini ve epidemik salgınların %3'ünü oluşturmaktadır (Pitout, Nordmann and Poirel 2015). Özellikle MDR suşların neden olduğu salgın hastane enfeksiyonları giderek endişe uyandırmaktadır. 1970'li yıllarda, bu suşlar esas olarak aminoglikozidlere dirençli Klebsiella suşları idi (Christensen and Korner 1972). 1982 yılından bu yana, genişletilmiş spektrumlu sefalosporin direncinden sorumlu GSBL üreten suşlar tespit edilmektedir (Medeiros 1993). Son yıllarda ise OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatının ilk kez Türkiye'de tanımlanmasından sonra İstanbul'da Mayıs 2006'dan Ocak 2007'ye kadar OXA-48 üreten *K. pneumoniae* izolatı salgınları bildirilmiştir (Carre'r et al 2008). Uzun yıllardır neredeyse tüm OXA-48 üreten izolatların bildirimleri, Türkiye'de hastaneye yatırılan hastalardan veya Türkiye ile bağlantılı hastalardan yapılmıştır (Aktas et al 2008, Kilic et al 2011, Karabay et al 2016). Bu tarihlerden günümüze kadar, prospektif ve retrospektif çalışmalar pek çok OXA-48 varyantını tanımlamıştır. OXA-162 varyantı Türkiye'de *K. pneumoniae* izolatlarında tespit edilmiştir. OXA-162, genel olarak beta laktamlara ve özellikle de karbapenemlere karşı aynı hidrolitik aktiviteye sahiptir. Son zamanlarda Almanya'da çeşitli türlerde tespit edilmiştir. Ardından, birçok spesifik enzimatik özellikler

sergileyen OXA-163 varyantı, Arjantin’de tespit edilmiştir. OXA-181 geni ise, ilk olarak Hindistan'daki birden fazla klonal olarak ilişkisiz *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır (Castanheira et al 2011). OXA-48'e çok benzeyen OXA-204 gen bölgesi Cezayir veya Tunus'la ilişkisi olan hastalardan alınan *K. pneumoniae* izolatında saptanmıştır (Charfi et al 2015). OXA-232 ise Fransa'daki Mauritius veya Hindistan'dan gelen hastalardaki *K. pneumoniae* izolatlarında tespit edilmiştir (Potron, Poirel, Rondinaud and Nordmann 2013). OXA-244 geni 13 Haziran 2013’te, İspanya’da tanımlanmıştır (Oteo et al 2013).

OXA-48 geninin tespitinden sonra Gülmez ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında çeşitli OXA-48 benzeri genlerin tespit edildiği bildirilmektedir. Pfeifer, Matten ve Rabsch’in (2009) yaptıkları araştırmada bazı *Enterobacteriaceae* izolatlarında OXA-162 geninin ortaya çıktığı bildirmiştir. Pedro Torres-Gonzalez ve ark.nın (2016) Meksika’da gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde OXA-232 geninin varlığı ve karbapenem direnciyle olan ilişkisi araştırılmıştır. Van der Zee ve ark. (2014), yeni kabul edilen hastalar aracılığıyla veya bir salgın sırasında fark edilmeden hastane ortamına taşınmasının erkenden tespit edilerek önlenmesi için bir moleküler tarama yöntemi kullanmış ve karbapenemaz genleri olan OXA-48, VIM, IMP, NDM ve KPC bölgelerini multipleks qPCR yöntemiyle saptamışlardır.

KPC üreten suşlar, ABD, Kolombiya, İtalya ve Yunanistan’da yüksek endemisiteye sahip, Brezilya, Arjantin, Norveç, Büyük Britanya, İspanya, Fransa, Almanya, Polonya, Avusturya, Macaristan ve Çin’de ise zaman zaman salgınlar meydana getirmektedir. Ülkemizde ise sporadik vakalar bildirilmiştir. NDM açısından Hindistan ve Pakistan endemik, Çin, Avustralya, Kolombiya, Suudi Arabistan, Umman, Irak, Mısır, İtalya, Fransa, Büyük Britanya salgınların bildirildiği bölgelerdendir. Türkiye, Rusya, Kanada, Norveç, İsveç, Finlandiya, Bosna-Hersek, Sırbistan ve Karadağ, Bulgaristan sporadik vakaların görüldüğü bölgeler içinde yer almaktadır (Nordmann and Poirel 2014). OXA-48 üreten kökenler, Türkiye, Libya, Mısır, Hindistan, Batı Sahra, Fas ve Bangladeş’te endemik, Kenya, Irak, İtalya, Hırvatistan, Büyük Britanya, İrlanda, İspanya, Fransa ve Almanya’da salgınların olduğu, Kanada, ABD, Brezilya, Arjantin, Cezayir, Güney Afrika, Norveç, Finlandiya, Çin, Avustralya, Pakistan ve İran sporadik vakaların görüldüğü bölgelerdir. IMP ve VIM üreten kökenlerin dünya çapında coğrafi dağılımı; Tayvan

ve Japonya IMP açısından yüksek prevalansa sahip, Türkiye, Lübnan, Hindistan, Avustralya, Portoriko, Brezilya, Birleşik Krallık, İspanya IMP salgınların bildirildiği bölgelerdir. Yunanistan ise VIM açısından yüksek prevalansa sahip, İspanya ve İtalya hastane içi salgınların gerçekleştiği ülkeler olarak bildirilmiştir (Nordmann et al 2011). Sakarya’da yapılan bir çalışmada 273 *K. pneumoniae* suşunun 2’sinde OXA-48 geni tespit edilmiştir, bu suşlarda KPC pozitifliğine rastlanmamıştır (Çiftci, Karakeçe, Aşık, Demiray ve Er 2013).

2.1.4. Yaptığı Enfeksiyonlar

Klebsiella spp., toplumdan edinilmiş bakteriyel pnömoninin bir etkeni olarak bilinir, özellikle kronik alkoliklerde ve şiddetli bir piyozjenik enfeksiyona bağlı karakteristik radyografik anormallikler gösteren bireylerde tedavi edilmezse yüksek mortaliteye sahiptir (Martin and Bachman 2018). Bununla birlikte, *Klebsiella* enfeksiyonlarının büyük çoğunluğu hospitalizasyon ile ilişkilidir. Fırsatçı patojenler olarak bilinen *Klebsiella spp.* suşları öncelikle hastaneye yatan bağışıklığı baskılanmış ve diabetes mellitus veya KOAH gibi ciddi altta yatan hastalıkları olan hastalarda enfeksiyon yaparlar. Nozokomiyal *Klebsiella* enfeksiyonlarında tıbbi açıdan en önemli tür *K. pneumoniae*’dir. Daha az sayıda, *K. oxytoca* insan klinik örneklerinden izole edilmiştir. Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa’da *Klebsiella spp.* suşları tüm hastane içi bakteriyel enfeksiyonların %8’ine neden olmaktadır. Genellikle diğer bölgelerde büyük bir coğrafi farklılık bulunmamaktadır. Amerika Birleşik Devletleri’nde *Klebsiella* tüm sağlık bakımı ile ilişkili bakteriyel enfeksiyonların %3 ila 7’sini oluşturmaktadır ve hastanelerde bildirilen en önemli sekiz enfeksiyöz patojenin arasında yer almaktadırlar (Horan et al 1988, Schaberg 1991). Birleşik Krallık’tan ve Almanya’dan toplanan veriler CDC tarafından rapor edilenlerle benzerlik göstermektedir (Bergogne-Berezin 1995, Ullmann 1986). İdrar yolu, bu enfeksiyonun en yaygın olarak görüldüğü bölgedir. *Klebsiella*, tüm sağlık bakımı ile ilişkili İYE’nin % 6 ila 17’sini oluşturmada ve nöropatik mesane veya diyabet hastaları gibi risk altındaki spesifik gruplarda, daha yüksek bir insidans göstermektedir (Noor, Ajaz, Rasool and Pirzada 2004). Sağlık bakımı ile ilişkili Gram negatif bakteriyemilerin bir etkeni olan *Klebsiella spp.*, *E. coli*’nin ardından ikinci sırada yer almaktadır (Yinnon, Butnaru, Raveh, Jerassy and Rudensky 1996, Vading, Nauc ler, Kalin and Giske 2018). Pediatri servislerinde nozokomiyal

Klebsiella enfeksiyonları özellikle sıkıntılı prematüre bebeklerde ve yoğun bakım ünitelerinde görülmektedir. Klebsiella türleri, hem erken hem de geç teşhis edilen enfeksiyonlarda neonatal sepsiste yer alan patojenlerdir (Simonsen, Anderson-Berry, Delair and Davies 2014). Antibiyotiğe dirençli suşların, özellikle genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten suşların yayılımı nedeniyle, Klebsiella enfeksiyonları yoğun ilgi görmeye başlamıştır.

2.1.5. Karbapenemaz Üreten Klebsiella Enfeksiyonlarının Tedavisi

Klebsiella pneumoniae karbapenemaz (KPC) üreten *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri ile enfekte olan hastaları tedavi etme seçenekleri sınırlıdır. Bazı izolatların sefamisinler ve sefepime duyarlı olduğu bildirilmiş olsa da, MİK (Minimum inhibitör konsantrasyonu) değerlerinin arttığı ve sınır değerlere yaklaşmış olduğu göze çarpmaktadır (Mushtaq, Ge and Livermore 2004). KPC üreten bakterilere bağlı sistemik enfeksiyonların tedavisinde ne genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler ne de karbapenemler endike olamayabilmektedir. Ayrıca, imipenem ve meropenem tedavisi sırasında, karbapeneme yüksek seviyede dirençli KPC üreten bakterilerin seçilebileceği gösterilmiştir (Hong et al 2005). Tedaviye klavulanik asit gibi bir inhibitör eklenmesi, in vitro β -laktamların aktivitesini arttırabilmektedir. Bununla birlikte, β -laktamların MİK değerleri, bir inhibitörle kombine edildiğinde duyarlılık sınır değerlerinin altına düşmez ve birçok KPC üreten bakteri, oksasilinazlar veya sefalosporinazlar gibi inhibitörlere dirençli β laktamaz enzimleri üretir. Sistemik enfeksiyonların tedavisinde β -laktamın klavulanik asit veya tazobaktamla kombine kullanılması yasaklanmıştır. Son zamanlarda, oksimino-sefalosporinlerin, yeni bir non- β -laktam β -laktamaz inhibitörü olan NXL104 ile kombinasyonunun, KPC enzimlerinin hidrolitik aktivitesine karşı etkili olduğu bulunmuştur (Bush 2018).

KPC üreten izolatlar genellikle β -laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençlidir. Çoğu izolat, florokinolonlara, aminoglikozidlere ve co-trimoksazole dirençlidir. Birkaç izolat amikasin veya gentamisine ve çoğu izolat kolistin ve tigesikline duyarlı olabilmektedir (Ruppé, Woerther and Barbier 2015). Tigesiklin, yumuşak doku enfeksiyonlarında kullanılan birçok *Enterobacteriaceae* üyesine karşı genişletilmiş aktiviteye sahip bir glisilsiklin grubu antibiyotiktir. Ayrıca düşük idrar konsantrasyonu nedeniyle idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı

önerilmemektedir. Polimiksinlerin nörotoksisitesi ve nefrotoksisitesi nedeniyle kullanımını sınırlıdır. Bu moleküllerin kullanımı ile ilgili yayınların büyük bir kısmı, VIM veya IMP gibi karbapenemazlar üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi içindir (Zavascki, Goldani, Li and Nation 2007, Falagas, Grammatikos and Michalopoulos 2008, Thaden, Pogue and Kaye 2017). KPC enfeksiyonlarının tedavisiyle ilgili çok sınırlı in vivo veri içeren çalışma mevcuttur (Bratu et al 2005a, Bratu et al 2005b).

2.1.6. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antibiyotik direncinin penisilin, penisilin türevleri, sefalosporinler, karbapenemler, sefamisinler ve monobaktamları içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan β -laktam antibiyotiklerinde direncin gittikçe arttığı ve bu durumun tüm antibiyotik kategorilerinde bir sorun haline geldiği açıktır. β -laktam antibiyotik grubu, klinik alanda kullanılan en büyük antibakteriyel ajan grubudur. Yapısı, kendilerine antibakteriyel etki kazandıran β -laktam halkası içeren dört üyeli nitrojendir (Konaklieva 2014). β -laktam antibiyotikleri, bakteriyel hücre duvar sentezinde yer alan transpeptidlere bağlanmalarını ve etkisiz hale getirmelerini sağlayan bakteriyel substratların bağlanma bölgeleriyle yapısal benzerliklere sahiptir (Johnson, Fisher and Mobashery 2013).

β -laktamlara direnç şu üç ana mekanizma ile gelişir; antibiyotik hedef alanının yapısındaki değişiklikler, antibiyotiğin yeterli konsantrasyonunun aktif bölgeye erişmesini engelleyen değişiklikler ve en yaygın ve en önemlisi antibiyotiklerin enzimatik inaktivasyonudur (Mulvey and Simor 2009). Hedefin yapısındaki bir değişiklik, antibiyotiğin hedefine bağlanamamasına neden olabilmektedir. β -laktam antibiyotikleri penisilin bağlama proteinlerine (PBP'ler) bağlanır ve PBP'lerin aktif bölgesindeki bir değişiklik, β -laktam antibiyotiklerinin afinitesini düşürebilir, bu nedenle bakterilerin bu ajanlara karşı direncini artırır (Drawz and Bonomo 2010). Bir antibiyotiğin hedefine ulaşmasını önlemek veya geçirgenlik bariyerinin bir sonucu olarak efluks pompa mekanizmasının varlığı bir direnç stratejisidir (Mulvey and Simor 2009).

Bakteriler, bir antibiyotiğin kimyasal yapısını değiştiren ya da yok eden, onu inaktif hale getiren enzimler üretebilmektedir. Bakterilerin bu antibiyotiklerin etkisine karşı

en etkili direnç yolu β -laktam antibiyotiklerinde, β -laktam halkasını hidrolize ederek antibiyotikleri inaktive eden enzimler olan β -laktamazları üretmek olmuştur (Kong, Schneper and Mathee 2010). GSBL'ler penisilinlere, birinci, ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama direnç sağlayan ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilen β -laktamazlardır (Rawat and Nair 2010). β -laktamazların hidrolitik etkisine karşı özel olarak tasarlanmış birçok yeni β -laktam antibiyotik geliştirilmiştir. Bununla birlikte her yeni sınıfta yeni β -laktamazlar ortaya çıkmış ve bu ilaç sınıfına karşı direnç ortaya çıkmıştır (Bradford 2001). Ambler sınıflandırması β -laktamazları protein homolojisine göre dört sınıfa ayırır. Bu sınıflandırmada yer alan β -laktamazlar, A, B, C ve D olmak üzere dört moleküler sınıfa ayrılır. Sınıf A, C ve D, enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulundurur, B sınıfı β -laktamazlar ise hidrolizi kolaylaştırmak için çinko iyonu kullanırlar (Ambler 1980). Bush ve Jacoby sınıflandırması ise enzimleri spesifik β -laktam sınıfı antibiyotikleri hidrolize edebilme yetenekleri ve β -laktamaz inhibitörlerinin (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamın) inaktivasyon özelliklerine göre ayırmıştır (Bush and Jacoby 2010). A, C ve D sınıfı beta-laktamazlar serin β -laktamazdır ve sınıf B ise metallo β -laktamazlardır.

OXA, oksasilin hidrolize edici β -laktamazların kısaltmasıdır ve 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında yaygın olarak kullanılan plazmid tarafından kodlanan β -laktamaz ailelerinden biridir (Queenan and Bush 2007). Araştırmamızda yer alan OXA-tipi β -laktamazlar D sınıfında yer almakta olup oksasilin hidrolize etme yeteneklerinden ötürü bu şekilde adlandırılmıştır. OXA'lar 1970'lerin sonunda ve 1980'lerin başında en yaygın plazmid aracılı β -laktamaz ailelerinden biri olarak tanımlanmıştır (Queenan and Bush 2007). OXA tipi enzimler, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olup hastane enfeksiyonlarından soyutlanan kökenlerde saptanmaktadır (Gür 2002).

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN AMACI

Karbapenemaz üreten izolatların neden olduğu enfeksiyonlar gün geçtikçe artmaktadır. Ülkemizde karbapenem direnciyle ilgili KPC, NDM ve OXA-48 gen bölgelerine sıklıkla rastlanmaktadır. OXA-48 enzimlerinin plazmid aracılığı ile aktarılması nedeniyle bakteriler arasında direncin hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır. Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son seçenek antibiyotikler olan karbapenemlere karşı gittikçe artmakta olan direnç için taramalar yapılması gerekmektedir. Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda daha çok NDM, OXA-48, KPC ve IMP gen bölgeleri birliktelikleri araştırılmıştır. Karbapeneme dirençli izolatlarda genellikle bu gen bölgelerinin varlığı araştırılmaktadır. OXA-48 benzeri gen bölgelerinden bazılarının araştırıldığı az sayıda çalışma vardır. Ancak ülkemizde OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerin tümünü araştıran bir çalışma mevcut değildir.

Ülkemizin OXA-48 tipi karbapenemazların başta Kuzey Afrika ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ile birlikte en önemli rezervuarları oluşturan bölgeler arasında olması nedeniyle bu gen bölgelerinin ülkemizdeki suşlarda irdelenmesi gerekmektedir. OXA-48 varyantlarından OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 bölgelerinin tümünün karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında araştırılması ilk defa bu çalışmada yapılmıştır.

OXA-48 varyantlarının yayılımı ile ilgili klinik sonuçlar oldukça önemlidir, çünkü bu enzimleri üreten suşların birçoğu EUCAST veya CLSI kriterlerine göre karbapenemlere duyarlı olarak sınıflandırılmıştır (Leclercq et al 2013, CLSI 2018). Bu kılavuzların önerdiği mevcut öneriler, izolatların bir karbapenemaz üretilip üretilmediğine bakılmaksızın, karbapenemlere karşı duyarlılığı bildirmektir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızın, OXA-48 varyantlarının tespiti ile klinik tedavi protokollerine karbapenemaz üreten suşların direnç nedenlerini genotipik olarak aydınlatması ve MİK değerlerinin değerlendirilmesi ile antibiyotik tedavilerinin yeniden gözden geçirilmesini düşündürmesi yönüyle katkı sağlanması amaçlanmıştır.

3.1.1. Araştırmanın Hedefleri

Karbapeneme dirençli karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşlarında OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerinin polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) aracılığıyla saptanmasını amaçlayan çalışmamızın hedefleri şunlardır:

- Hastanemizde *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 enzimlerinin saptanarak karbapenem direncinin genetik olarak irdelenmesi sonucunda tedavi protokollerine katkı sağlanması,
- Karbapenem dirençli suşların duyarlılıklarının azalma nedenlerini açıklayıp etkisiz antibiyotik tedavilerinin yeniden gözden geçirilmesinin sağlanması,
- *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde karşılaşılan karbapenem direncinin mekanizmasının anlaşılabilmesi ile gereksiz ilaç yükünün getirdiği tıbbi ve ekonomik zararların azaltılması,
- OXA-232, OXA-181, OXA-162, OXA-204, OXA-244, OXA-163, OXA-245 gen bölgelerini hızlı bir şekilde tespit edebilecek fenotipik testlere zemin oluşturması ve bu sayede yerli tanı kitleri yapımına alt yapı sağlanması.

3.2. ARAŞTIRMANIN YAPILDIĞI YER VE TARİH

Araştırma 15.10.2016-30.10.2017 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.3. ARAŞTIRMANIN ÖRNEKLEMİ

Araştırmanın örneklemini bir üniversite hastanesinin tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına, 15.10.2016-30.10.2017 tarihleri arasında çeşitli kliniklerden gelen örneklerden izole edilen karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşları oluşturmuştur.

3.4. SUŞLARIN TOPLANMASI VE BAKTERİLERİN İZOLASYONU

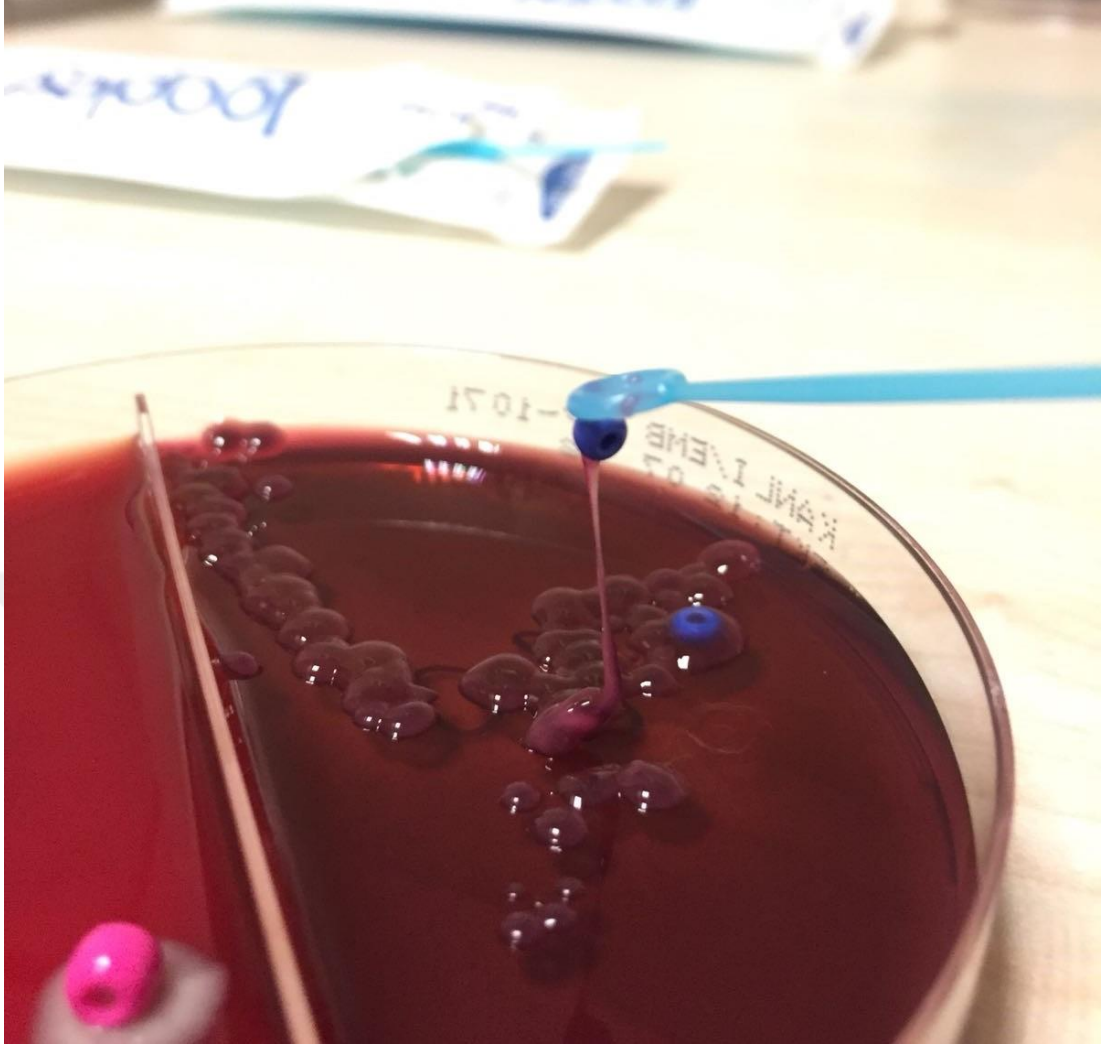
Çalışma öncesinde Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 27.09.2016 tarihinde 161 karar numarası ile onay alınmıştır (Ek 1). Çalışmaya Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden ve yoğun bakım ünitelerinden gönderilen klinik örneklerden (kan, idrar, rektal sürüntü, balgam, trakeal aspirat, kateter, periton vb.) elde edilen 100 bakteri izolatu dahil edilmiştir. Klinik örnekler kültür için koyun kanlı ve eosin metilen blue (EMB) besiyerlerine ekilerek 35-37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Kan kültürü örnekleri tam otomatik kan kültürü sistemi BacTAlert (bioMerieux, Fransa) cihazında 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. *K. pneumoniae* üreme pozitifliği saptanan şişelerden alınan örneklerin tekrar alt kültürleri yapılmıştır. Elde edilen izolatlar çalışılncaya kadar kriyoprezervatif sıvı içerisinde mikroorganizmaları tutucu özellikte olan porlu yapıya sahip içinde en az 10 adet boncuk bulunan boncuklu saklama besiyerinde -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

3.5. İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOGRAF ÇALIŞMALARI

3.5.1. İdentifikasyon

Kültür sonuçları önce konvansiyonel olarak koloni morfolojisine göre değerlendirilmiştir. Daha sonra mikroskopik incelemede Gram negatif, basil morfolojisinde, Şekil 3.5.1.'de görüldüğü gibi EMB besiyerinden pembe-menekşe renkli, mukoid koloniler *Klebsiella spp.* şüphesiyle identifikasyon ve antibiyogram testi yapılması için işleme alınmıştır. Bakteri kolonilerinin 16-18 saatlik taze kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanıp Vitek 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemine yüklenmiştir. Yaklaşık 8-16 saatlik inkübasyon sonucunda bakteriler identifiye edilmiştir.



Şekil 3.5.1. *Klebsiella spp.*'nin EMB besiyerinde görünümü (Sünme testi pozitif mukoid koloniler)

3.5.2. Antibiyogram

Antibiyogram çalışması için identifikasyon amacıyla hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri çözeltilisinden 145 µl alınarak yeni hazırlanmış olan 3 ml'lik steril deney tüpündeki serum fizyolojik ile süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonları Gram negatif antibiyogram kartlarına önerilen şekilde dağıtıldı ve cihaza yerleştirildi. Her bir antibiyogram kartı liyofilize olarak antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını ve Mueller Hinton Broth içermektedir. Bu kartlar mikrodilüsyon tekniğinin küçültülmüş ve kısaltılmış şekliyle MİK/breakpoint değerini tespit etmektedir.

3.5.2.1. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu

Broth mikrodilüsyon metodu hem kantitatif (MİK) hem de kalitatif sonuç almamızı sağlamaktadır. Bakterilerin MİK değerleri, belirli bir türün direnç seviyesini belirlemede yardımcı olabilmekte ve belirli antimikrobiyal ajanların tedavide kullanılmasına ilişkin kararı önemli ölçüde etkileyebilmektedir.

Mikrodilüsyon metodu 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklarda yapılmıştır. Bu yöntem;

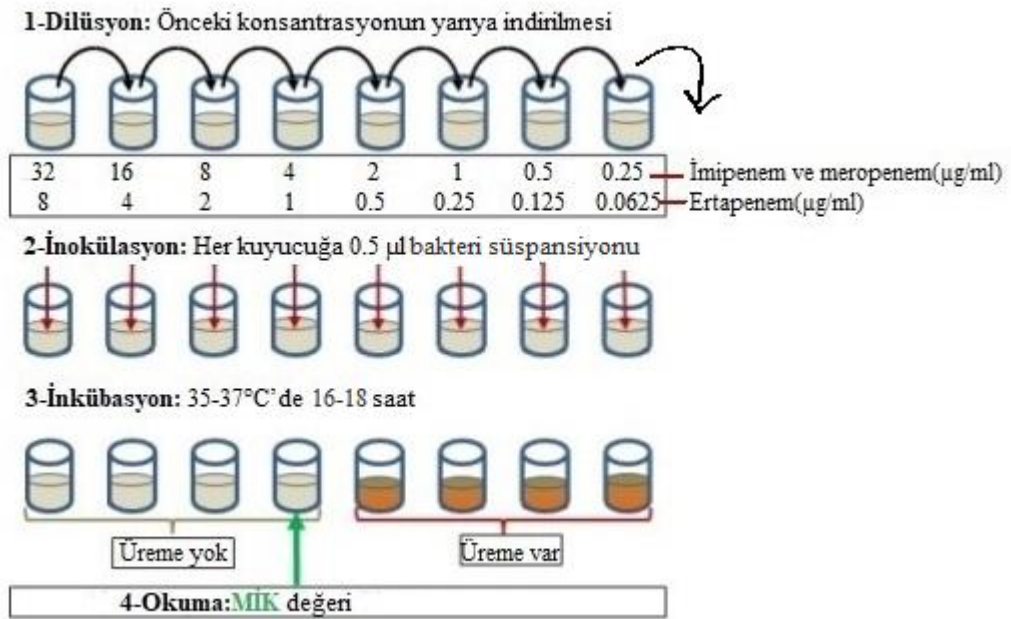
- Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması
- Antibiyotik seyreltme aralığının hazırlanması
- Agar seyreltme plakalarının hazırlanması
- İnokülasyonların hazırlanması
- İnokülasyon
- İnkübasyon
- Okuma ve sonuçların yorumlanması aşamalarından oluşmaktadır.

Antibiyotik stok solüsyonu piyasada bulunan antibiyotiklerin liyofilize formları (verilen potens ile) kullanılarak hazırlanmıştır. İmipenem için piyasada silastatin ve imipenem kombine biçimde bulunmaktadır. Fakat silastatin sonuçları etkilememektedir. Standart bir solüsyon için gerekli antibakteriyel toz veya seyreltici miktarı aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/ml})}{\text{Potens } (\mu\text{g/mg})}$$

Çalışma için antibiyotiklerin sınır değerlerine göre yapılan hesaplamalar sonucunda; 3.2 mg imipenem 100 ml fosfat tamponu ile, 3.2 mg meropenem 100 ml su ile ve 0.8 mg ertapenem 100 ml fosfat tamponu ile sulandırılmıştır (imipenem 32 µg/ml, meropenem 32 µg/ml, ertapenem 8 µg/ml). Stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra her bir bakteri için fotometrik yöntemle yoğunluk 0.5 McFarland standardına ayarlanıp, 1:10 oranında MHB ile dilüe edilmiştir. Mikropklaktaki tüm kuyucuklara 0.1 ml MHB konulduktan sonra ilk kuyucuğa hazırlanmış olan antibiyotik solüsyonundan 0.1 ml eklenmiştir ve en az üç kez pipetaj yapılmıştır. Antibiyotik eklenen kuyucuktan 0.1

ml sıvı alınıp diğer kuyucuğa eklenmiş ve seri dilüsyon yapılmıştır. Son kuyucuğa geldiğinde 0.1 ml sıvı alınıp dışarı atılmıştır. Böylece antibiyotik süspansiyonu 8 kez dilüe edilmiştir. Bütün plaklarda bir adet sterilit kontrol ve bir adet üreme kontrol kuyucuğu bırakılmıştır. Ardından sterilit kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 0.5 µl bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Her bir suş için çalışma yapılmıştır. 35-37°C’de 16-18 saatlik inkübasyon sonrasında sonuçlar değerlendirilmiştir. İmipenem, meropenem ve ertapenemi için her bir suşun tamamen inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Her bir mikroplakta 6 suşun MİK çalışması yapılmıştır. (Şekil 3.5.2.)



Şekil 3.5.2. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematize edilmiş görüntüsü.

3.6. KARBAPENEM DİRENCİNİN DOĞRULANMASI

3.6.1. Disk Difüzyon Testi

Otomatize cihazda karbapeneme dirençli olarak bildirilen *K. pneumoniae* suşları karbapenem direncini konvansiyonel yöntemlerle de belirlemek amacıyla Kirby-Bauer disk difüzyon tekniği ile test edilmiştir. Bu test CLSI ve EUCAST önerileri dikkate alınarak Mueller Hinton Agar (MHA) da gerçekleştirilmiştir (EUCAST 2017, CLSI 2018). Kültür plaklarında saf koloni olarak üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0.5 McFarland

bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edilmiştir. Elde edilen bu süspansiyondan steril eküvyon kullanılarak MHA besiyerine ekim yapılmıştır. Her bir plak için birer ertapenem, imipenem ve meropenem antibiyotik diski plak kenarlarından 15 mm ve birbirinden 25-30 mm mesafede olacak biçimde yerleştirilmiştir. Hazırlanan petri kapları 35-37°C'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra inhibisyon çapları ölçülmüştür.

3.6.2. Modifiye Hodge Testi

Yapılan çalışmalarda KPC enzimi üreten izolatlarda bu testin duyarlılığının % 100'e yakın olduğu gözlemlenmiştir (Hirsch et al 2014). Ayrıca başka bir çalışmada da MHT'nin OXA-48 benzeri karbapenemazlar üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarını saptamak için yüksek duyarlılığa sahip olduğu ve bu nedenle klinik mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında kullanılabileceği gösterilmiştir (Girlich, Poirel and Nordmann 2012). Disk difüzyon testi sonucunda karbapeneme dirençli bulunan izolatların taze pasajları yapılarak karbapenemaz üretimi tespiti için Modifiye Hodge yöntemi kullanılmıştır. Modifiye Hodge Testi için, CLSI klavuzundaki yönergelere göre *E. coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland bulanıklığındaki süspanسیونunun, triptik soy buyyon ile 10'da 1 oranında dilüe ederek eküvyon ile Mueller-Hinton agar plağına yayılıp, 3-10 dk bekletildikten sonra petrinin merkezine 10 µg ertapenem diski yerleştirilmiştir. Şüpheli kolonilerden alınıp, diske doğru 20-25 mm'lik çizgi çekilmek suretiyle 35-37°C'de 16-18 saat inkübe edildikten sonra test bakterisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme (yonca yaprağı görünümü) pozitif olarak değerlendirilmiştir (CLSI 2018).



Şekil 3.6.1. Modifiye Hodge Testi yonca yaprağı görünümü.

3.7. GENOTİPİK TESTLER

Genotipik çalışmalar için canlandırma besiyerlerinde çoğaltılan suşlardan DNA ekstraksiyonu yapılarak, Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qPCR) yöntemi ile OXA-48 gen bölgeleri araştırılmıştır. Bu yöntemle OXA-48 gen pozitifliği saptanan suşların OXA-48 benzeri varyantları High Resolution Melting Analysis (HRMA) yöntemi ile tanımlanmıştır. HRMA'da OXA-48 benzeri gen bölgeleri açısından pozitiflik saptanan bakteriyel DNA dizi analizi yapılmıştır.

3.7.1. Nükleik Asit İzolasyonu

Moleküler çalışmalar için öncelikli olarak, Qiasymphony SP (Qiagen Inc.; Hilden, Germany) cihazı ile üreticinin talimatlarına uygun şekilde 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonlarından DNA ekstraksiyonu (QIASymphony DSP DNA Kits, Germany) yapılmıştır. Tüm numuneler için DNA miktarı ve kalitesi spektrofotometrik yöntem ile ölçülmüştür (Nanodrop Technologies Inc.; Wilmington, DE).

3.7.1.1. Real Time PCR

100 ayrı bakteriye ait saflaştırılmış DNA örnekleri üretici talimatları doğrultusunda Rotor Gene (Qiagen Inc.; Hilden, Germany) cihazında Thermo Scientific™ Maxima

SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kullanılarak qPCR reaksiyonuna tabi tutulmuştur. PCR protokolü olarak Tablo 3.7.1.'deki koşullar kullanılarak 35 siklusta yapılmıştır.

Tablo 3.7.1. PCR koşulları

PCR aşamaları	Sıcaklık (°C)	Süre	
İlk denatürasyon	94°C	10 dk	
Denatürasyon	94°C	30 sn	35 döngü
Bağlanma	95°C	30 sn	
Uzama	72°C	1 dk	
Son uzama	72°C	10 dk	

OXA-48 Forward (5' 3') TTGGTGGCATCGATTATCGG ve OXA-48 Reverse (3' 5') GAGCACTTCTTTTGTGATGGC dizilimlerini içeren primer karışımları yukarıdaki tabloda verilen PCR koşulları altında Thermo Scientific™ Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) kullanılarak PCR miksi hazırlanmıştır (Poirel, Heritier, Tolun and Nordmann 2004).

- 12.5 µl Master Mix
- 0.5 µl OXA-48 Forward primer
- 0.5 µl OXA-48 Reverse primer
- 10.5 µl distile su ve
- 1 µl DNA eklenerek miks hazırlanmıştır.

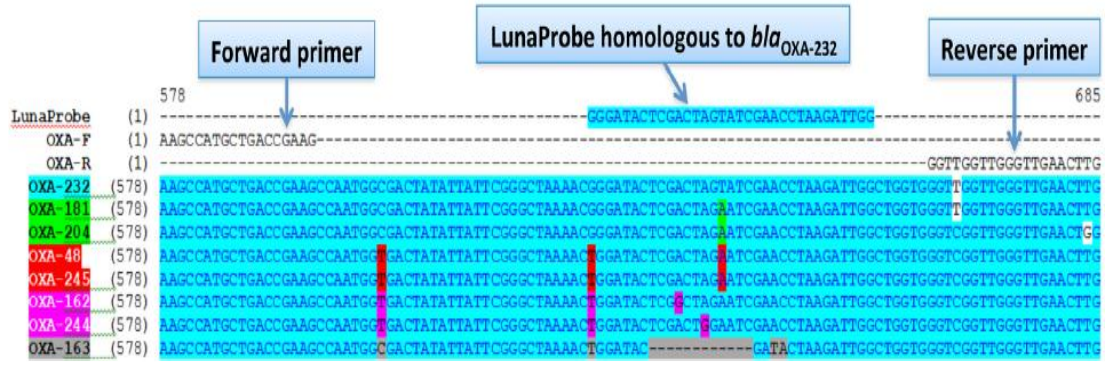
Hazırlanan örnekler Rotor Gene (Qiagen Inc.; Hilden, Germany) cihazında qPCR reaksiyona tabi tutulmuştur. PCR sonuçları reaksiyon ile eş zamanlı olarak (Real time PCR) bilgisayar ekranındaki grafiklere bakılarak yorumlanmıştır.

3.7.1.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (HRMA) ve Dizileme

Bu yöntem, yüksek çözünürlüklü DNA erime eğrisi analizi ile PCR ürünlerinin eş zamanlı mutasyon taramasına ve genotiplenmesine izin verir. Doymuş bir floresan DNA boyası (Eva Green) ve etiketlenmemiş oligonükleotid problemlerin (3'fosfat işaretli) varlığında gerçekleştirilen asimetric PCR kullanılarak elde edilir. Hem PCR

amplikonlarının hem de amplikon-prob duplekslerinin floresan erime eğrileri analiz edilir. PCR amplikon erime geçişinin şekli heterozigotların varlığını gösterirken, etiketlenmemiş prob-amplikon dupleksinin eritilmesiyle spesifik genotipleme sağlanır. Erime geçişlerinin hiyerarşik olmayan kümelenmesi, farklı dizi varyantlarını otomatik olarak gruplandırır ve bu da ortak değişkenlerin kolayca tanınmasına ve genotiplenmesine izin verir. Bu teknik, tek nükleotid polimorfizmlerini ve küçük insersiyonları ve delesyonlarını incelemek ve ilişkili genetik bozuklukları teşhis etmek için hem laboratuvar araştırmalarında hem de klinik ortamlarda kullanılabilir (Montgomery, Wittwer, Palais and Zhou 2007).

HRMA için forward primer; OXA-F, 5'-AAGCCATGCTGACCGAAG-3' ve reverse primer OXA-R, 5'-CAAGTTCAACCCAACCAACC-3' OXA-48 benzeri genlerdeki mutasyonu amplifiye eden PCR primerleri Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) saflaştırma yöntemiyle dizayn edilmiştir. Buna ilaveten OXA-232 β -laktamaz gen amplikonunun OXA-P, 5'-GGGATACTCGACTAGTATCGAACCTAAGATTGG-3' ters dizisine tamamlayıcı olarak etiketlenmemiş 3'-fosforillenmiş bir oligonükleotid probu, ayırım gücünü arttırmak için tasarlanmıştır (Montgomery et al 2007). 1:5'lik bir F/R primer konsantrasyon oranına sahip asimetric PCR, proba bağlanacak olan yüksek oranda ters-sarmal tek-iplikli DNA (ssDNA) üretmek için gerçekleştirilmiştir, bu da geliştirilmiş ssDNA-probuna ait dupleks eriyik sinyalleri ile sonuçlanmıştır. Erime eğrisi grafikleri uMeltSM v2.0.2 yazılımı kullanılarak elde edilmiştir. 12.5 μ l Type-it HRM PCR Kiti içeriğindeki master miks (Qiagen Inc.; Hilden, Germany), 10.1 μ l su, 0.2 μ l OXA-F, 1 μ l OXA-R ve klinik izolatlardan hazırlanan 1 μ l genomik DNA son hacim 25 μ l olacak şekilde PCR karışımı hazırlanmıştır. Erime reaksiyonu ise 50°C'den 90°C'ye, saniyede 0.02°C'lik bir sıcaklık artışı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. PCR döngüsü parametreleri ve reaksiyon karışımı Tablo 3.7.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7.1. OXA-48 gen bölgesi ve varyantları arasındaki nükleotid farklılıkları, referans alınan primer ve prob dizilimleri. (Hemarajata, Yang, Hindler and Humphries 2015)

Primer ve prob için Şekil 3.7.1.'de bulunan OXA-48 bölgesine ait 108 bazlık kısım kullanılmıştır.

Tablo 3.7.2. HRM parametreleri ve PCR koşulları

PCR Karışımı	PCR parametreleri	
12.5 µl Type-it HRM master miks	10 dk 95° C	
10.1 µl su	10 sn 95° C	
0.2 µl OXA-F primer	15 sn 58° C	35 döngü
1 µl OXA-R primer	10 sn 72° C	
0.2 µl prob		
1 µl genomik DNA	40°C' de 1 dk, sonrasında	
Toplam: 25 µl karışım	50°C'den 95°C'ye, saniyede 0.02°C'lik bir sıcaklık artışı ile gerçekleştirilmiştir.	Erime

İlgili gen bölgeleri Sanger dizi analizi yöntemi ile ABI 3500 (ThermoFisher Scientific) cihazı ile firma tarafından çalışılmıştır. Teknik, DNA'yı kopyalarken

DNA polimerazı ile zincir sonlandıran dideoksitükleotitlerin dahil edilmesine dayanmaktadır. DNA, A, C, G ve T bazlarının kimyasal olarak değiştirilmiş versiyonlarının varlığında replike edilir. Bu bazlar çoğalma sürecini, DNA'nın büyüyen iplikçiklerine dahil olduklarında durdururlar ve bu da çeşitli uzunluklarda kısa DNA'lar ile sonuçlanır. Bu kısa DNA iplikçikleri büyüklüklerine göre sıralanır ve son bazlar en kısıdan en uzun parçaya kadar okunarak, orijinal DNA'nın tüm dizisi ortaya çıkarılır ve bu dizilimler elektroferogram denilen grafiklerde gösterilir (Sanger, Nicklen and Coulson 1977).

Dizi analizi için PCR ürünlerine ExoSAP-IT® (USB PN 78200, ABD) enzimi kullanılarak saflaştırma uygulanmıştır. ExoSAP enzimi Reaksiyon Protokolü:

- 37 °C 45 dk
- 80 °C 15 dk
- Sonsuz: 4°C şeklindedir.

Daha sonra Sekans PCR'ı uygulanmış olup, protokolü aşağıdaki gibidir:

- 96 °C 1 dk

25 döngü aşağıdaki şekildedir:

- 96 °C 10 sn
- 50 °C 5 sn
- 60 °C 4 dk
- Sonsuz: 4°C

Sekans PCR'ından alınan örnekler jel filtrasyon kromatografisi Sephadex kolon uygulamasıyla saflaştırılmış olup, sonrasında ABI 3500 (ThermoFisher Scientific) Genetik Analizatör cihazında okutulmuştur.

3.8. SONUÇLARIN ANALİZİ

Yapılan testler sonucunda;

- Çalışmaya dahil edilen izolatların antibiyotik duyarlılık test sonuçları,
- Her bir suşa ait karbapenem grubu antibiyotiklerin MİK değerleri,

- Karbapenemaz üreten suşlardan OXA-48 bölgesi içeren suşların oranı,
- OXA-48 benzeri gen bölgelerine sahip olan suşların oranı ve bu bölgelerin nükleotid dizimleri elde edilmiştir.

Elde edilen bu sonuçların analizi istatistiksel olarak IBM SPSS 24.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programı kullanılarak yapılmıştır. Kategorik değişkenler arasındaki ilişki ki-kare analizi ile test edilmiştir. Duyarlılık ve güven aralıkları hesaplanmıştır. Yöntemler arasındaki uyum için katsayı hesaplanması yapılmıştır. Tanımlayıcı istatistik olarak frekans, yüzde ve ortalama \pm standart sapma değerleri verilmiştir. Sonuçta, $p < 0.05$ olan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında incelenen 100 adet *K. pneumoniae* suşunun;

- İzole edildiği hastaların demografik özelliklerine ilişkin bulgular,
- izole edildiği klinik örnek türlerine ve geldiği kliniklere ilişkin bulgular,
- MİK değerlerine ilişkin bulgular,
- PCR sonuçlarına ilişkin bulgular,
- HRMA sonuçlarına ilişkin bulgular ve
- Sanger dizi analizi yöntemine ait bulgular sunulmuştur.

4.1. SUŞLARIN SOYUTLANDIĞI HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN BULGULAR

Bu bölümde *K. pneumoniae* suşlarının izole edildiği hasta grubunun cinsiyet özellikleri ele alınmıştır. Bulunan değerler sayı (n) ve yüzde (%) olarak gösterilmiştir. Tablo 4.1.1.'de görüleceği üzere hastaların %52'sinin erkek, %48'inin kadın olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.1.1.Suşların izole edildiği hastaların cinsiyet dağılımları

Cinsiyet	Sayı (n)
Kadın	48
Erkek	52
TOPLAM	100

4.2. SUŞLARIN İZOLE EDİLDİĞİ KLİNİK ÖRNEK TÜRLERİNE ve GELDİĞİ KLİNİKLERE İLİŞKİN BULGULAR

İkinci bölümde izolatların laboratuvara gelen klinik örnek türlerine göre ve geldiği kliniklere göre sınıflandırması yapılmıştır. Tablo 4.2.1.'de görüldüğü gibi *K. pneumoniae*'nin en çok izole edildiği ilk üç klinik örnek rektal sürüntü, kan ve idrar örnekleri olarak bulunmuştur.

Tablo 4.2.1. İzolatların klinik örneklerle göre dağılımları

Klinik Örnek Türü	Sayı (n)
Balgam	2
Yara	2
Rektal sürüntü	65
Kan	19
İdrar	9
Trakeal aspirat	3
TOPLAM	100

Tablo 4.2.2.'de karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının en çok yoğun bakım ünitesinden (%89) gönderildiği görülmektedir.

Tablo 4.2.2. Suşların kliniklere göre dağılımları

Klinikler	Sayı (n)
Cerrahi	2
Çocuk Hastalıkları	1
Dahiliye	3
Enfeksiyon Hastalıkları	2
Gastroenteroloji	2
Ortopedi	1
Yoğun Bakım Ünitesi	89
TOPLAM	100

4.3. MİK DEĞERLERİNE İLİŞKİN BULGULAR

Üçüncü bölümde MİK değerleri otomatize ve konvansiyonel olmak üzere iki farklı yöntemin sonuçları ele alınmıştır.

Mikrodilüsyon testinin sonuçları U tabanlı mikroplate üzerindeki bulanıklık göz ile okunmasıyla değerlendirilmiştir. (Şekil 4.3.1.)



Şekil 4.3.1. Sıvı mikrodilüsyon testinin mikroplate üzerindeki görünümü

Bulunan sonuçlar; test yöntemi ve referans arasındaki uyumu (%) belirlemek ve sonuçlar arasındaki herhangi bir uyumsuzluğu belirlemek için Tablo 4.3.3.'te karşılaştırılmıştır. İzolatlar, değerlendirilmekte olan yöntemle göre duyarlı, referans yöntemle göre dirençli olarak bulunduysa, “çok büyük hata” olarak sınıflandırılmıştır. Referans metodu ile dirençli değerlendirilen izolat değerlendirilmekte olan yöntemle duyarlı olarak bulunduysa “büyük hata” ve referans yöntemle dirençli yada duyarlı, değerlendirilen yöntemle orta duyarlı olarak yorumlandıysa sonuçlar “küçük hata” olarak kategorize edilmiştir. Her iki yöntemle de aynı sonuç saptandıysa kategorik uyumlu olarak değerlendirilmiştir (Nayak et al 2007). Dirençli ve duyarlı olma durumları EUCAST sınır değerleri Tablo 4.3.2'deki verilere göre yorumlanmıştır (EUCAST 2018).

Tablo 4.3.2. Karbapenem Grubu Antibiyotiklerin *Enterobacteriaceae* EUCAST Sınır Değerleri.

*Zon çapları, içeriğinde 10 µg antibiyotik bulunan diskler içindir.

Antibiyotikler	MİK Sınır Değerleri (mg/L)		Disk Difüzyon Zon Çapı(mm)*	
	S (≤)	R (>)	S (≥)	R (<)
İmipenem	2	8	22	16
Meropenem	2	8	22	16
Ertapenem	0.5	1	25	22

Tablo 4.3.3. Sıvı mikrodilüsyon ve otomatize sistemde bulunan duyarlılık/direnç durumlarının karşılaştırılması

Metod	Duyarlılık durumları	İmipenem	Meropenem	Ertapenem
VITEK 2	S	6	7	2
	I	54	5	3
	R	40	88	95
TOPLAM		100	100	100
Sıvı mikrodilüsyon yöntemi	S	2	2	3
	I	53	18	4
	R	45	80	93
TOPLAM		100	100	100
İki yöntemin kategorik açıdan karşılaştırılması	Çok büyük hata	1	0	0
	Büyük hata	2	3	2
	Küçük hata	15	20	8
	Kategorik uyum	82	77	90

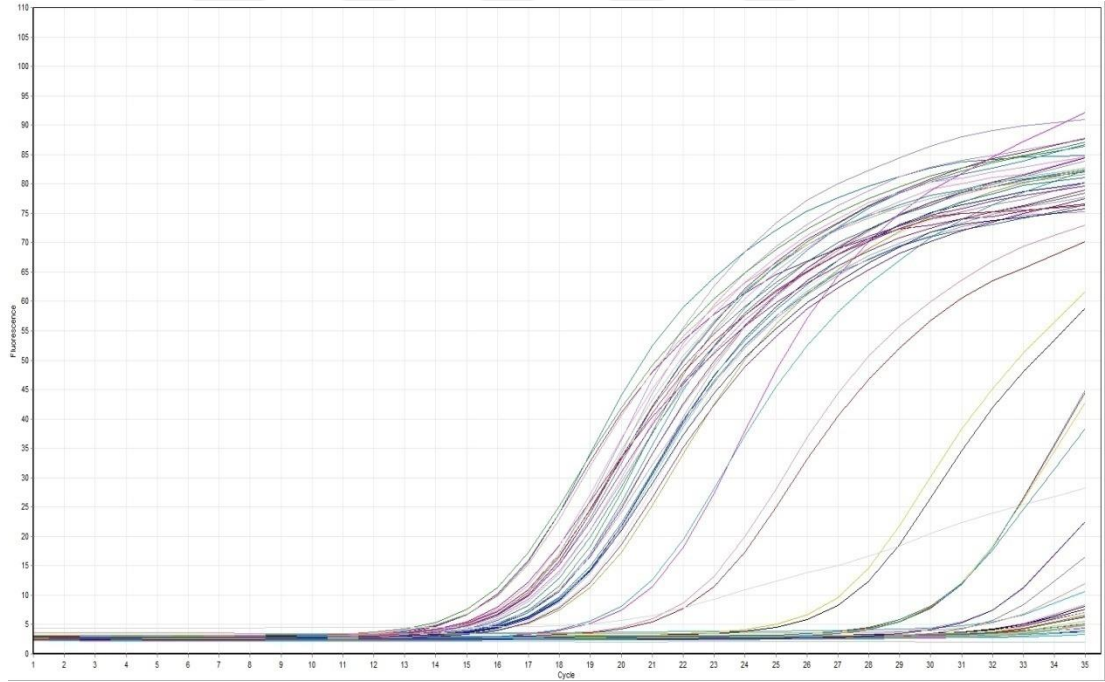
*Yöntemlerin karşılaştırılması % cinsinden yazılmıştır.

Tablo 4.3.3.'teki verilere göre; imipenem için VITEK 2 ve mikrodilüsyon yöntemi arasında %82, meropenem için %77, ertapenem için %90 kategorik uyum saptanmıştır. Çok büyük hata yalnızca bir suşta imipenem duyarlılığı değerlendirilirken bulunmuştur.

4.4. PCR SONUÇLARINA İLİŞKİN BULGULAR

Bulguların dördüncü bölümünde qPCR yöntemi sonuçları ele alınmıştır. Bu yöntemde karbapeneme dirençli suşların OXA-48 gen bölgesi pozitiflikleri araştırılmıştır. Gerçek zamanlı PCR gerçekleştirirken, amplifikasyon sırasında fluoresan sinyal birikiminin ilerlemesinin ilk ölçüldüğü nokta CT (cycle threshold) değeri olarak adlandırılır. CT değeri olarak reaksiyon eğrisinin eşik çizgisiyle kesiştiği noktadaki döngü sayısı değerlendirilmiştir.

100 *K. pneumoniae* suşunun 45 tanesinde OXA-48 gen bölgesi pozitif olarak saptanmıştır. (Şekil 4.4.1.)



Şekil 4.4.1. PCR sonuçlarına ait grafik

Tablo 4.4.1. OXA-48 pozitifliği saptanan suşların MİK ve CT değerleri

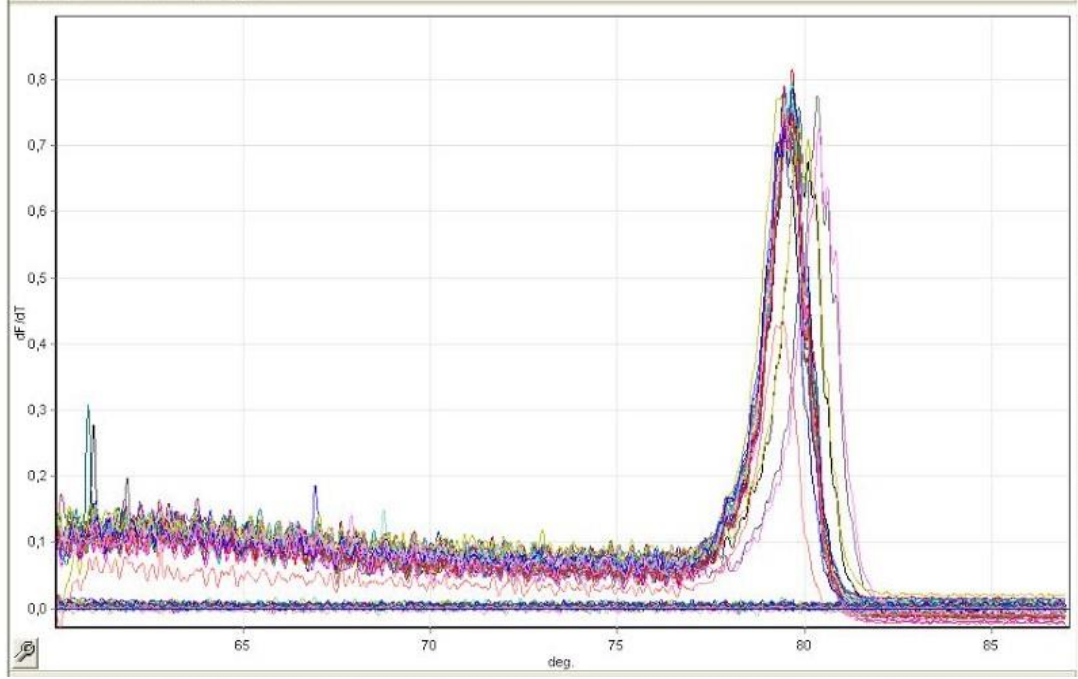
Suşlar	MİK Değerleri (µg/ml)			CT Değerleri
	İmipenem	Meropenem	Ertapenem	
<u>1</u>	4	16	16	19
<u>2</u>	0.5	0.5	0.5	17
<u>3</u>	8	16	16	17
<u>4</u>	2	8	16	19
<u>5</u>	8	16	8	18
<u>6</u>	0.5	0.5	1	17
<u>7</u>	8	16	16	18
<u>8</u>	8	16	16	18
<u>9</u>	16	16	16	19
<u>10</u>	8	16	8	18
<u>11</u>	4	8	16	31
<u>12</u>	8	32	32	19
<u>13</u>	1	8	8	16
<u>14</u>	16	16	8	19
<u>15</u>	16	16	8	31
<u>16</u>	16	16	2	23
<u>17</u>	16	16	8	24
<u>18</u>	16	8	1	28
<u>19</u>	16	8	4	17
<u>20</u>	16	8	8	34
<u>21</u>	16	16	1	19
<u>22</u>	16	16	8	18
<u>23</u>	16	4	4	21
<u>24</u>	8	4	2	18

<u>25</u>	16	16	2	17
<u>26</u>	4	16	4	18
<u>27</u>	32	16	8	19
<u>28</u>	32	16	8	17
<u>29</u>	32	32	8	33
<u>30</u>	32	32	16	31
<u>31</u>	4	8	0.25	35
<u>32</u>	16	32	1	18
<u>33</u>	16	16	8	28
<u>34</u>	8	16	4	18
<u>35</u>	2	4	0.5	23
<u>36</u>	4	4	2	18
<u>37</u>	16	8	4	18
<u>38</u>	32	16	4	17
<u>39</u>	16	16	0.5	16
<u>40</u>	16	32	1	16
<u>41</u>	16	16	8	33
<u>42</u>	16	4	8	21
<u>43</u>	32	32	8	17
<u>44</u>	16	8	8	17
<u>45</u>	32	16	8	17

Tablo 4.4.1.'deki veriler analiz edildiğinde suşların imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri ile CT değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmadığı saptanmıştır ($p>0,01$; Sırasıyla imipenem, meropenem ve ertapenem ile CT değerleri arasındaki anlamlılık düzeyleri; $p=0,52$, $p=0,86$, $p=0,1$).

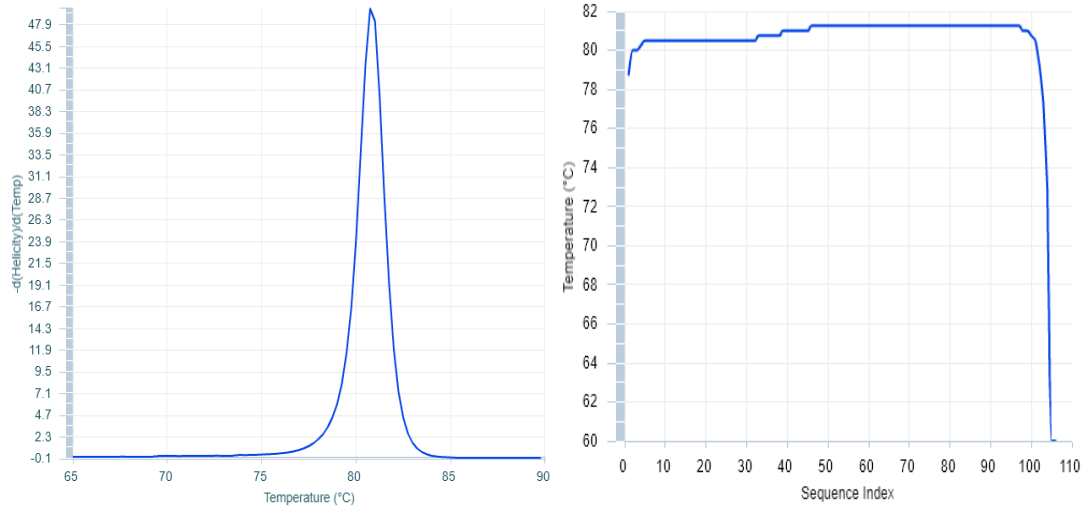
4.5. HRMA SONUÇLARINA İLİŞKİN BULGULAR

Bulguların beşinci bölümünde HRMA sonuçları değerlendirilmiştir. Bu yöntemde, qPCR ile OXA-48 gen bölgesi pozitiflikleri saptanan suşların asimetric PCR kullanılarak erime eğrilerindeki değişimler yorumlanmıştır.

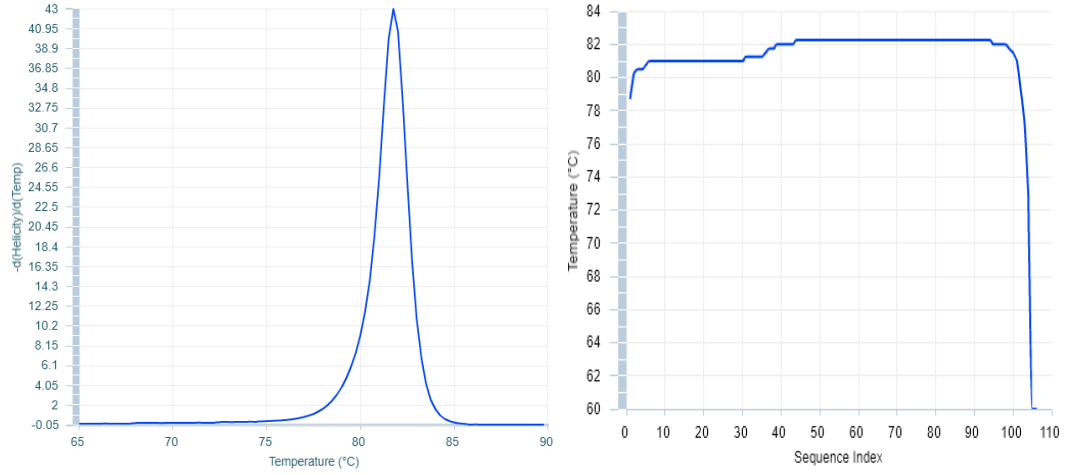


Şekil 4.5.1. HRMA sonucunda elde edilen grafik

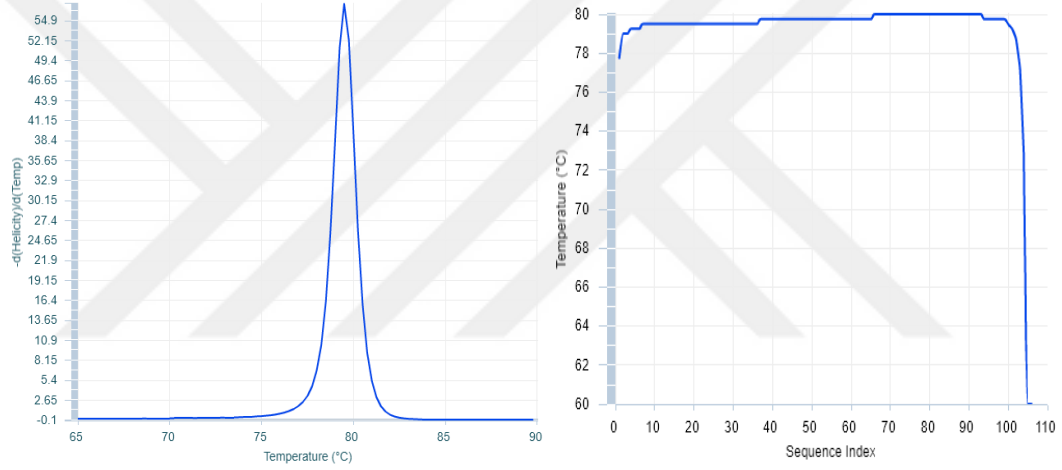
Şekil 4.5.1.'de görülen üst üste binmiş tepe noktaları aynı erime sıcaklığına sahip OXA-48/OXA-245 gen bölgesine sahip suşları ifade etmektedir. Bu eğri kümelerinden sapmalar varyantların varlığı hakkında bize ipucu vermektedir.



Şekil 4.5.2. OXA-181 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri



Şekil 4.5.3. OXA-244 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri



Şekil 4.5.4. OXA-48 içeren suşlara ait erime eğrisi ve erime profili grafikleri

Şekil 4.5.2., Şekil 4.5.3. ve Şekil 4.5.4. sırasıyla OXA-181, OXA-244 ve OXA-48 gen bölgelerini içeren suşlara ait erime eğrisi türev grafiklerini ve erime reaksiyonlarının sıcaklık-baz dilimi profillerini göstermektedir. Grafikler uMeltSM v2.0.2 yazılımı kullanılarak elde edilmiştir.

T_m değerleri diğer suşlara göre farklılık arz eden olan 17 suş hedef bölgenin dizi analizi için ayrılmıştır.

4.6. SANGER SEKANS YÖNTEMİNE AİT BULGULAR

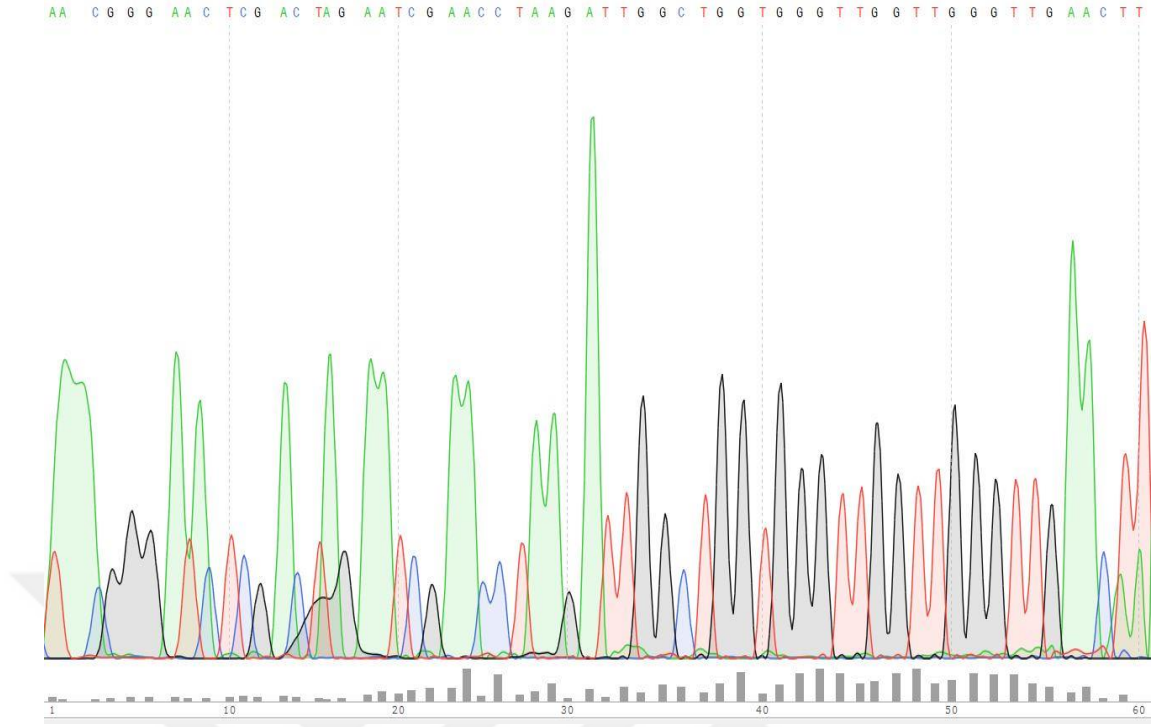
Bulguların altıncı bölümünde dizi analizi yaptırılan 17 suşun nükleotid dizilimleri ve nokta mutasyonları ele alınmıştır. Dizi analizi sonucunda, Şekil 4.6.1.'de örneği verilen elektroferogram görüntüleri ve dizilere ait fasta formatları yorumlanmıştır.

Bulunan diziler NCBI Blast veritabanına kopyalanarak hangi gen bölgesine ait olduğu belirlenmiştir.

Şekil 3.7.1.'de görüldüğü gibi bizim kullandığımız primer bölgesinde OXA-48 ve OXA-245 gen bölgelerinin baz dizilimleri birebir aynıdır. Bu nedenle OXA-48 gen bölgesine ait dizilimi sağlayan suşlarda hem OXA-48 hem de OXA-245 pozitif olduğu kabul edilmiştir. Yapılan değerlendirmeler sonucunda 41 suşun OXA-48/OXA-245 gen bölgelerini içerdiği, 2 suşun OXA-181 ve 2 suşun da OXA-244 gen bölgelerini içerdiği tespit edilmiştir. Tablo 4.6.1.'de dizi analizi sonucunda elde edilen dizilerin fasta formatı görülmektedir. OXA-181, OXA-48'den 2 baz mutasyonu ile, OXA-244 ise tek baz mutasyonu ile ayrılmaktadır. OXA-181 ve OXA-244 pozitifliği bulunan suşlarla OXA-48 gen bölgesi üreten suşlar arasında One-Way ANOVA testi sonucunda imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. ($p < 0.05$, $p = 0.6$).

Tablo 4.6.1. Sanger sekans sonucu elde edilen baz dizileri

Gen Bölgeleri	Nükleotid Dizilimleri
OXA-48	AAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGACTATATTATTCGGGCTAAAAC GGATACTCGACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGT TGAACCT
OXA-181	AAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGCGACTATATTATTCGGGCTAAAACG GGATACTCGACTAGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGT TGAACCT
OXA-244	AAGCCATGCTGACCGAAGCCAATGGTGACTATATTATTCGGGCTAAAAC GGATACTCGACTGGAATCGAACCTAAGATTGGCTGGTGGGTTGGTTGGGT TGAACCT



Şekil 4.6.1. OXA-181 gen bölgesine ait forward dizilimin elektroferogram görüntüsü

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae türleri, özellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae* sağlık bakımıyla ilişkili ve toplum kaynaklı bakteriyel enfeksiyonların en önemli nedenleri arasındadır (Paterson 2006). β -laktam grubu antibiyotikler bu enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan ana ilaç sınıfı olduğundan, bu ajanlara karşı gelişen direnç klinik tedavide önemli bir sorun oluşturmaktadır. Diğer bir endişe, karbapenemlere karşı direnç gelişmesidir. Çünkü bu ajanlar, MDR *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde son seçenektir (Livermore and Woodford 2006).

Ambler D sınıfı β -laktamazlar (oksasilinazlar) klinik olarak ilgili Gram negatif bakteriler arasında giderek artan bir hızla yayılmaktadır. Bu enzimler, β -laktamlara karşı dardan geniş uzanan çeşitli spektrumlarda hidroliz aktivitesi sergileyebilmektedir (Poirel, Naas and Nordmann 2010). D sınıfı β -laktamazlar arasında yer alan birkaç enzim karbapenemleri hidrolize eder. OXA-48'den türemiş olan varyantlar başlangıçta *K. pneumoniae*'de, daha sonra diğer *Enterobacteriaceae* türlerinde Türkiye'de tanımlanmıştır (Poirel et al 2004, Poirel, Potron and Nordmann 2012). Bu varyantlar OXA-48'den bir ile beş amino asit mutasyonu ayrılmakta ve farklı β -laktam hidroliz spektrumu sergilemektedirler (Dortet et al 2015). Son çalışmalar ve epidemiyolojik gözlemler OXA-48 benzeri enzim üreticilerin birçok ülkede giderek daha fazla tanımlandığını göstermiştir.

OXA-162 ilk kez bir *K. pneumoniae* izolatında 2009 yılında Türkiye'de, daha sonra 2011 yılında Yunanistan'da tespit edilmiştir (Kasap, Torol, Kolayli, Dundar and Vahaboglu 2013, Voulgari et al 2016). OXA-163, ilk olarak Arjantin'de *K. pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* izolatlarında tanımlanmıştır (Poirel et al 2011, Abdelaziz et al 2012). OXA-181 ilk kez Hindistan'da bir *K. pneumoniae* izolatında, OXA-204 Kuzey Afrika ile bağlantısı olan hastalarda *K. pneumoniae* izolatlarında, OXA-232 Fransa'dan Mauritius'a transfer edilmiş bir hastadan alınan bir *K. pneumoniae* izolatında Fransa'da tanımlanmıştır (Potron et al 2011, Potron, Nordmann and Poirel 2013, Potron et al 2013). OXA-244 ve OXA-245 ilk kez İspanya'da *K. pneumoniae* izolatlarında, OXA-247 Arjantin'de bir *K. pneumoniae* izolatında ve OXA-370 Brezilya'da bir *Enterobacter hormaechei* izolatında bildirilmiştir (Gomez et al 2013, Oteo et al 2013, Sampaio et al 2014).

OXA-48 varyantları kendi aralarında çok küçük baz değişiklikleri ile farklılık göstermektedirler. OXA-162, OXA-232, OXA-244, OXA-245 ve OXA-370 tek bir aminoasit ikamesiyle, OXA-163 bir aminoasit ikamesi ve 4 aminoasit delesyonu, OXA-181 dört aminoasit, OXA-204, OXA-247 iki aminoasit ikamesi, OXA-245 dört aminoasit delesyonu ile OXA-48'den türemişlerdir (Mairi, Pantel, Sotto, Lavigne and Touati 2018).

Yaklaşık iki yıl öncesine kadar 11 adet OXA-48 varyantı (OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-199, OXA-204, OXA-232, OXA-244, OXA-245, OXA-247, OXA-370, OXA-405) olduğu bilinmekteydi (Mairi et al 2018). Ceccarelli ve ark.nın 2017 yılında yaptığı bir çalışmada çevreden ve hayvanlardan izole ettikleri *Shewanella spp.* suşlarında OXA-514 ve OXA-515 varyantları tanımlanmıştır. Ardından Bogaerts ve ark.nın (2017) Belçika'da yaptıkları çalışmada *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde OXA-427, Dabos ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmalarda *E.coli*'de OXA-517, *Shewanella bicestrii sp. nov.*'de OXA-519 ve OXA-535, Samuelsen ve arkadaşları ise OXA-436 gen bölgelerini raporlamışlardır (Dabos et al 2017a, Dabos et al 2017b, Dabos et al 2017c, Samuelsen et al 2017).

Yıllarca neredeyse tüm OXA-48 üreten izolatların bildirimleri, Türkiye'de hastaneye yatırılan hastalardan ya da Türkiye ile bağlantılı hastalardan yapılmıştır (Aktas et al 2008, Kilic et al 2011). OXA-48 geninin tespitinden sonra Gülmez ve ark. (2004) tarafından yapılan bir çalışmada *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında çeşitli OXA-48 benzeri genlerin tespit edildiği bildirilmektedir. Pfeifer, Matten ve Rabsch'in (2009) yaptıkları araştırmada bazı *Enterobacteriaceae* izolatlarında OXA-162 geninin ortaya çıktığı bildirmiştir. Pedro Torres-Gonzalez ve ark.nın (2016) Meksika'da gerçekleştirdikleri çalışmada ise *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde OXA-232 geninin varlığı ve karbapenem direnciyle olan ilişkisi araştırılmıştır.

MHT, Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (CPE) üyelerinde Ambler sınıfı A KPC ve sınıf D OXA-48 karbapenemazları saptamak için mükemmel duyarlılık gösterirken, NDM üreticilerini bazen tespit edememektedir. Bu testin klinik mikrobiyoloji rutin laboratuvarlarında kullanılabileceği gösterilmiştir (Girlich et al 2012). Yapılan çalışmalarda KPC enzimi üreten suşlarda bu testin duyarlılığı %100'e yakın bulunmuştur (Hirsch et al 2014). Kim, Park, Sung ve Kim (2015) NDM üreten suşlarda MHT'nin MBL üreticilerinin sadece %60.6'sını tespit ettiğini

bildirmişlerdir. Fakat yalancı pozitiflikleri önlemek için antibiyotik diskinde çinko sülfat ilavesi yapılmaktadır (Jesudason, Kandathil and Balaji 2005). Karbapenemaz üreten izolatları saptamak için MHT kullanılması ilk olarak Lee ve ark. (2001) çalışmalarında, indikatör *E. coli* süspansiyonu hazırlanırken, 0.5 McFarland bulanıklığının "1:10 seyreltimi" tercih edilmiştir. CLSI da ayrıca indikatör organizmalar için inokulum yoğunluğu olarak 1:10 seyreltilmiş bir 0.5 McFarland seyreltmesiyle yapılmış MHT'yi ve Modifiye Karbapenemaz İnaktivasyon Metodunu önermektedir (CLSI 2018). CLSI yönergelerine uygun olarak yapılan bizim çalışmamızda ise MHT sonucunda pozitif bulunan 100 suşun 45 tanesinin OXA-48 benzeri gen bölgelerini içerdiği saptanmıştır.

Oueslati, Normann ve Poirel (2015) tarafından yapılan çalışmada OXA-163 veya OXA-232 üreten rekombinant suşların, diğer OXA-48 türevlerini üretenlere göre daha düşük MİK değerlerine sahip olduğu gözlemlenmiştir. OXA-181 üreten suşların, en yüksek karbapenem MİK'lerini gösterdiğini, OXA-48, OXA-162 ve OXA-204 üreticileri için hemen hemen aynı MİK değerlerini elde ettiklerini bulmuşlardır. Ancak bu gen bölgeleri, porin eksikliği olan suşlar ile birleştirildiğinde, MİK değerlerindeki artış OXA-48'in daha yüksek düzeyde karbapenem direncine sahip olabileceğini göstermektedir. Dimou, Dhanji, Pike, Livermore ve Woodford (2012) tarafından yapılan çalışmada OXA-181 üreten izolatların diğer direnç geni bölgelerini içeren suşlara göre yüksek imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri dikkat çekmektedir. Nordmann ve ark.nın (2012) çalışmasında OXA-181 üreten izolatların KPC, IMP, VIM, NDM ve GSBL üreten izolatlara göre daha düşük karbapenem MİK değeri gösterdiği bildirilmiştir. Çalışmamızda OXA-181 ve OXA-244 pozitifliği bulunan suşlarla OXA-48 gen bölgesi üreten suşlar arasında One-Way ANOVA testi sonucunda imipenem, meropenem ve ertapenem MİK değerleri arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Gen bölgeleri arasında MİK değerleri açısından anlamlı fark bulunamasa da, OXA-181 üreten suşların MİK değerlerinin diğer suşlara göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu bulgu literatürdeki çalışmalar ile uyumludur.

Fattouh ve ark. (2016), CPE mikroorganizmaları arasındaki meropenem MİK dağılımında, KPC üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının %25'inin ve OXA-48 benzeri genleri taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatlarının %40'ının CLSI sınır değerlerinin altında olduğunu bulmuşlardır ($MİK \leq 1 \mu\text{g/ml}$). Bu nedenle,

karbapenemaz taranmasında tek bir kılavuzun evrensel olarak optimal tarama stratejilerine sahip olmasını beklemek mümkün görülmemektedir. Oueslati ve ark. (2015) OXA-48 benzeri enzim grubunun, protein dizilimi açısından oldukça homojenite göstermesine rağmen, hidrolitik profil açısından oldukça heterojen olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, karbapenemaz aktivitelere sahip OXA-48 benzeri enzimleri kodlayan genlerin saptanmasında, sadece bu genlerin PCR bazlı amplifikasyonu yetersiz kalmaktadır. Gen bölgelerinin dizi analizi, ilgili enzimlerin kinetik profilini tahmin etmek için gerekmektedir.

Van der Zee ve ark. (2014), karbapenem dirençli etkenlerinyeni kabul edilen hastalar aracılığıyla veya bir salgın sırasında fark edilmeden hastane ortamına taşınmasının erkenden tespit edilerek önlenmesi için bir moleküler tarama yöntemi kullanmış ve karbapenemaz genleri olan OXA-48, VIM, IMP, NDM ve KPC bölgelerini real-time PCR yöntemiyle saptamışlardır. OXA-48 benzeri genleri barındıran izolatların birbirinden ayrımını yapabilen bir test mevcut değildir. Birçok OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten bakteri, geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı duyarlı olsa da düşük seviyeli karbapenem direncine sahip olmaktadır ve bu farklılıklar OXA-48 varyantlarını daha yaygın olarak karşılaşılan KPC'lerden güvenilir bir şekilde ayırt edememektedir (Doi et al 2014). Üstelik, aynı klinik izolatlarda birden fazla β -laktamaz oluşumu organizmaların β -laktamlara karşı genel duyarlılığını etkileyebilmekte ve bu da OXA-48 varyantlarının fenotipik ayrımını zor veya imkansız kılabilmektedir (Potron et al 2013).

OXA-48 için diğer karbapenemaz genlerini de saptayan multipleks PCR testleri birkaç çalışmada rapor edilmiştir (Poirel et al 2004, Aubert, Naas, Héritier, Poirel and Nordmann 2006, Poirel, Walsh, Cuvillier and Nordmann 2011, Kaase, Szabados, Wassill and Gatermann 2012, Poirel, Bonnin and Nordmann 2012, Pollett et al 2014). Ayrıca, DNA mikroarray tekniği de OXA-48 ve diğer yaygın olarak karşılaşılan karbapenemazları tanımlamak için kullanılmıştır (Naas, Cuzon, Bogaerts, Glupczynski and Nordmann 2011). Bununla birlikte, yüksek homoloji gösteren OXA-48-like genlerin hızlı tespiti ve kesin şekilde ayrılması için hiçbir moleküler analiz yöntemi geliştirilmemiştir.

Ouertani ve ark. (2017) 13 karbapenemaz üreten suşta OXA-48 pozitifliğini %93, OXA-204 pozitifliğini ise %7 olarak bulmuşlardır. OXA-48 benzeri

karbapenemazlar, ABD'de *Enterobacteriaceae* üyelerinde son derece nadir olduğu bildirilmiştir. CDC verilerine göre, OXA-48 benzeri üreten CPE suşları, Ağustos 2015 itibarıyla sadece 19 eyaletten 43 hastada tespit edilmiştir (Lyman et al 2015). Brink ve ark. (2013) *K. pneumoniae* suşlarında %2.5 OXA-48, %11.2 OXA-181 pozitifliği bulmuşlardır. Lutgring ve ark. (2018) 30 adet CRE suşunda OXA-181 (% 43), OXA-232 (%33) ve OXA-48 (%23) oranlarını bulmuştur. Jeong ve ark. (2016) 79 CRE izolatının %59.5'inin OXA-232 genini barındırdığını bildirmiştir. Ülkemizde 2014-2015 yıllarında OXA-48 üreten suşların en yüksek epidemiyolojik seviyesine (evre 5 “endemik durum”) sahip olduğu bildirilmiştir (Albiger, Glasner, Struelens, Grundmann and Monnet 2015).

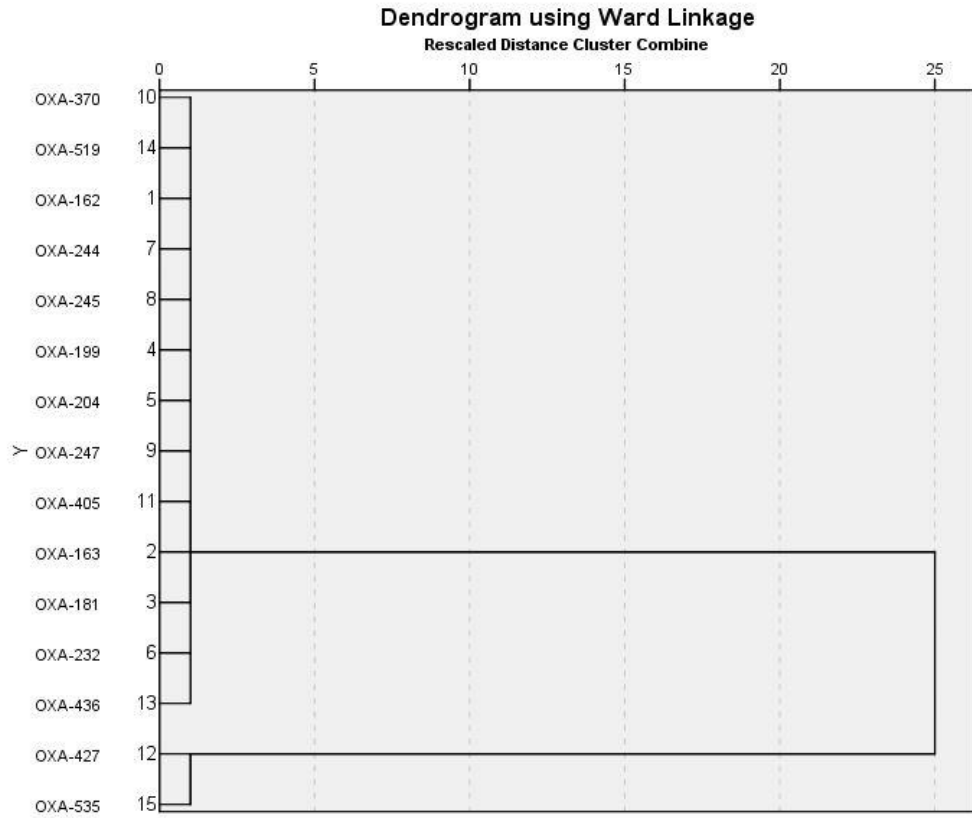
Baran ve Aksu'nun (2016) yaptıkları çalışmada, 181 CRE izolatının %92'sinin OXA-48 benzeri üreten bakteriler olduğu fakat bu varyantların ayrımı için dizileme yapılmadığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, 100 adet karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşunun %45'i OXA-48 gen bölgesi açısından pozitif bulunmuştur. Bu suşların da %91.2'sinin OXA-48/OXA-245, %4.4'ünün OXA-181 ve %4.4'ünün OXA-244 gen bölgelerini ihtiva ettiği bulunmuştur. Prevalans oranlarındaki bu farklılıklar; çalışılan yöntem, gen bölgelerinin bulunduğu izolatlar, bölgelerin epidemiyolojileri, suşlar arasında klonal ilişki bulunup bulunmadığı gibi pek çok faktöre bağlıdır.

HRMA, genotipleme ve tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) hem araştırma amaçlı hem de klinik ortamlarda başarılı bir şekilde belirlenmesi amacıyla oldukça yüksek ve bir duyarlılık ve özgüllük ile kullanılmıştır (Liew et al 2004, Reed and Wittwer 2004, Erali, Voelkerding and Wittwer 2008). Bununla birlikte, sadece az sayıda çalışmada, bakteriyel genotiplemede yüksek homolojiye sahip sekanslar arasında hızlı bir ayırım yapmak için HRMA kullanılmıştır ve sadece bir çalışma bakterilerdeki tek nükleotid mutasyonlarını (A'dan G'ye) saptamak için HRMA kullanmıştır (Wolff, Thacker, Schwartz and Winchell 2008, Jin et al 2012).

OXA-181 ve OXA-204 ile OXA-232'nin nükleik asit sekansları, sadece bir baz çifti (642. pozisyonda T) ile bir aminoasit mutasyonuna (R214S) neden olmaktadır (Potron et al 2013). Bu mutasyon, enzimin karbapenemlere karşı hidrolitik aktivitesinde azalmaya, ancak penisiline karşı artan aktivitesine sebep olmaktadır. Bu

tek baz çiftlik ikame iki allelin amplikonlarında erime sıcaklıkları açısından ince bir farklılık oluşturmaktadır ve HRMA ile varyantlar arasında ayırım yapabilmek mümkün olmaktadır. Küçük bir amplikon üretmek için PCR tasarımıyla birlikte 3'fosfat işaretlenmiş prob analizi ile birleştirilmiş HRMA kullanımı, varyantların nükleik asit sekansları arasındaki ince farkın belirlenmesinde identifikasyon başarısına katkıda bulunmuştur (Hemrajata et al 2015). Ancak bu bölgelerin dizi analizi olmadan enzim tipi kesin olarak belirlenmemektedir.

Roth ve Hanson (2013) *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde KPC-2 ve KPC-3 gen bölgeleri varlığını araştırmak için HRMA yöntemini kolaylıkla kullandıklarını, dizileme ile doğrulandığında ise %100 özgüllük ve duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Girault ve ark. (2018) *Burkholderia mallei* suşlarıyla tüm genom sekanslama (WGS) ile karşılaştırmalı olarak HRMA metodunu kullanmışlar ve sonuçların WGS ile uyumlu olduğunu bildirmişlerdir. Chan (2012) tez çalışmasında *Mycobacterium tuberculosis* izolatlarında izoniazid direncini saptamak için HRMA yöntemini kullanmış, bu yöntemin %77.2 saptama hassasiyetine ve %97.8 özgüllüğe sahip olduğunu belirtmiştir. Kimathi (2016), tez çalışmasında *Salmonella spp.* izolatlarının identifikasyonu için 16S rRNA bölgesi için spesifik V1, V3 ve V6 primerleri kullanılarak HRMA yöntemini kullanmış, duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğunu belirtmiştir. Woksepp ve ark. (2014) *Enterobacteriaceae* suşlarının tanımlanmasında HRMA ve Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemlerini karşılaştırmalı olarak çalışmışlar ve aralarında %97 uyum gözlemişlerdir. Andersson, Harris, Tong ve Giffard (2009) tarafından yapılan çalışmada ise SHV geninin klinik olarak anlamlı 238. ve 240. kodonu SNP'lerini sorgulamak için HRM bazlı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu metot, bizim çalışmamızdan farklı olarak prob kullanılmadan SYBR Green tabanlı bir ana karışımdan yararlanmıştır.



Şekil 5.1. OXA-48 varyantları arasındaki homolojileri gösteren dendrogram.

Şekil 5.1, SPSS (Version 24) paket programında Ward Bağlantı Kümeleme Yöntemiyle hazırlanmıştır. Dal uzunlukları ölçeğe göre çizilmiştir ve aminoasit değişikliklerinin sayısı ile orantılıdır. OXA-48 varyantlarının OXA-48 gen bölgesiyle olan aminoasit benzerlikleri gösterilmektedir. OXA-427 ve OXA-535 haricindeki varyantlar arasındaki homolojiler kuvvetli olduğundan bu varyantlar birer ve ikişer birimlik mesafelerde gruplar meydana getirmişlerdir. Bu küçük aminoasit farklılıkları nedeniyle varyantlar arasında ayırım yapabilmek için PCR tabanlı yöntemler yeterli olamamaktadır. Dolayısıyla varyantlar arasında ayırım yapabilmek için OXA-48 benzeri genlerin dizi analizi gerekmektedir (Poirel et al 2012).

Çalışmamızda HRMA ile tespit edilen suşlardan 4 tanesinin dizi analizi ile OXA-48 varyantı olduğu doğrulanmıştır. 2 tanesinin OXA-181 ve 2 tanesinin de OXA-244 olduğu bulunmuştur. Bu varyantların Şekil 4.5.1.'de kümelenmeden sapma gösteren varyantların T_m derecelerinin artışı A-T arasındaki ikili bağların G-C arasındaki üçlü bağa dönüşmesine bağlanmıştır. Varyantlardaki bu aminoasit ikameleri Tablo

4.6.1.'de gösterilmiştir. HRMA yönteminin özgüllüğü çoğu çalışmada yüksek bulunmasına rağmen bazı kısıtlamaları bulunmaktadır. Tek bir alanda kümeleşen homozigot varyantlar arasında başarılı ayırım çoğunlukla T_m ' ye bağlıdır. Genotipleme için mutlak sıcaklık farklarını kullanma yeteneği, cihazın sıcaklık hassasiyetine (Herrmann, Durtschi, Bromley, Wittwer and Voelkerding 2006) ve karşılaştırılan örneklerin tutarlılığına (iyonik dayanıklılığına) bağlıdır (Seipp et al 2007). Tek baz varyantlarının çoğu yaklaşık 1°C'lik T_m farklılıkları ile sonuçlanırken, bir kısmı da 0.25°C civarında ve bazılarının erime sıcaklıklarının ise en yakın komşu termodinamiği ile aynı olduğu tahmin edilmektedir (Liew et al 2004). Ayrıca, farklı sulandırma tamponları ve konsantrasyonları T_m 'leri etkileyebilmektedir (Seipp et al 2007).

HRMA, bunların dışında iyi bir PCR reaksiyonu, kullanılan cihaz ve boyalara güçlü bir şekilde bağımlıdır. Örneğin, LCGreen Plus, SYTO 9'dan, Eva Green, SYBR Green'den daha iyi ayırım yapabilmektedir (Farrar, Reed and Wittwer 2009). Ayrıca küçük insersiyonlar ve delesyonlar, ikamelere göre tespit edilmesi biraz daha zor olabilmektedir (van der Stoep et al 2009). Sonuçların doğruluğu, cihazın ve yazılımının yorumlanmasına subjektif olarak bağlıdır (Herrmann et al 2006).

Aynı zamanda bu tarz araştırmalar, epidemiyolojik çalışmalara temel sağlaması, karbapenemaz tespiti ile ilgili yerli tanı kitlerinin yapımına taban oluşturması, rutin laboratuvarlarda zaman tasarrufu sağlaması ve kliniklere doğru ve etkin sonuçların iletilmesi nedeniyle önem arz etmektedir. OXA-48 varyantlarının antibiyotik direnç paternlerinin farklılık göstermesi nedeniyle tedaviye yol göstericidir. Bu nedenle varyantların tiplendirilmesinin klinisyenlere fayda sağlayacağı düşünülmektedir. HRMA'nın pratik bir yöntem olmaması rutin laboratuvarlarda kullanımını zorlaştırmaktadır. Ancak yoğun bakım hastaları gibi özel hasta gruplarında ve klinisyenin isteği doğrultusunda çalışılabilir. Bu sebeple asıl olarak araştırma amaçlı kullanılmaktadır.

Sonuç olarak;

- OXA-48 konsensus primeri ile tarama yaptığımız qPCR sonucunda 100 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* suşunda %45 oranında OXA-48 pozitifliği bulunmuştur. Dizi analizi sonucunda 13 suşun OXA-48/OXA-245 (kullandığımız primer bölgesindeki dizilimlerin birebir aynı olması nedeniyle ayırım

yapılamamıştır) gen bölgelerini içerdiği, 2 suşun OXA-181 ve 2 suşun da OXA-244 gen bölgelerini içerdiği tespit edilmiştir.

- Çalışmamız, ülkemizde OXA-48-like gen bölgelerini en kapsamlı şekilde araştıran ilk çalışma olması nedeniyle önem arz etmektedir.
- Karbapenem direncine neden olan gen bölgelerinin tespiti için ilgili yerli tanı kitlerinin yapımına zemin oluşturması açısından önemlidir.
- OXA-48 gen bölgelerinin diğer gen bölgeleri ile birlikteliklerinin araştırılmasına,
- SNP'lerin tespitini sağlayan HRMA yönteminin geliştirilmesi ve optimizasyonuna, dizi analizi ile paralel gitmesi açısından homojen ve daha büyük örneklemelere sahip planlı çalışmalara gereksinim duyulmaktadır.



KAYNAKLAR

- Abdelaziz MO, Bonura C, Aleo A, El-Domany RA, Fasciana T, Mammina C. (2012). OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae* in Cairo, Egypt, in 2009 and 2010. J Clin Microbiol, 50(7): 2489-2491.
- Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. (2008). Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-48 persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. Chemotherapy, 54(2): 101-106.
- Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) working group. (2015). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: assessment by national experts from 38 countries. Euro Surveill, 20(45): pii=30062.
- Amadi VA, Peterson R, Matthew-Belmar V, Sharma R, Harry Hariharan H. (2015). Prevalence and Antibiotic Susceptibility of Gram negative Aerobic Bacteria Cultured from the Intestine and Hepatopancreas of Blue Land Crab (*Cardisoma guanhumi*) in Grenada, West Indies. BMRJ, 5(2): 169-179.
- Amako K, Meno Y, Takade A. (1988). Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. J Bacteriol, 170(10): 4960-4962.
- Ambler RP. (1980). The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 289(1036): 321-331.
- Andersson P, Harris T, Tong SY, Giffard PM. (2009). Analysis of bla(SHV) codon 238 and 240 allele mixtures using SYBR green high-resolution melting analysis. Antimicrob Agents Chemother, 53(6): 2679-2683.
- Aubert D, Naas T, Héritier C, Poirel L, Nordmann P. (2006). Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. J Bacteriol, 188(18): 6506-6514.
- Bagley S, Seidler RJ, Brenner DJ. (1981). *Klebsiella planticola* sp. nov.: a new species of *Enterobacteriaceae* found primarily in nonclinical environments. Curr Microbiol, 6(2): 105-109.

- Baran I, Aksu N. (2016). Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 15(2016): 20-31.
- Bergogne-Berezin E. (1995). Nosocomial pathogens: new pathogens, incidence, prevention. *Presse Med*, 24(2): 89-97.
- Bogaerts P, Thierry N, Evrard S, Bouchahrouf W, Saegeman V, Lasserre C, Tande D, De Bolle X, Huang T, Glupczynski Y. (2017). Analysing and overcoming carbapenemase-mediated resistance OXA-427, a new plasmidic ESBL class D OXA-carbapenemase recovered from *Enterobacteriaceae* clinical isolates. In: Abstracts of the Twenty-seventh European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 2017. Abstract P1307. ESCMID, Basel, Switzerland.
- Bradford PA. (2001). Extended-Spectrum b-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4): 933-951.
- Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. (2005)a. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. *Arch Intern Med*, 165(12): 1430-1435.
- Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. (2005)b. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, N.Y.: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother*, 56(1): 128-132.
- Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Corcoran C, Van Greune J, Deetlefs D, Nutt L, Feldman C, Richards G, Nordmann P, Poirel L. (2012)b. The spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in South Africa: Risk factors for acquisition and prevention. *South African Medical Journal*, 102(7): 599-601.
- Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, Richards GA, Feldman C, Nutt L, van Greune J, Deetlefs JD, Swart K, Devenish L, Poirel L, Nordmann P. (2013). Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in South Africa and Evidence of In Vivo Selection of Colistin

- Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 51(1): 369-372.
- Broberg CA, Palacios M, Miller VL. (2014). *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000 Prime Reports*, 6: 64-76.
- Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. (1978). Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol*, 80(1978): 1-35.
- Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 54(3): 969-976.
- Bush K. (2013)a. Carbapenemases: Partners in crime. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 1(1):7-16.
- Bush K. (2018). Game Changers: New β -Lactamase Inhibitor Combinations Targeting Antibiotic Resistance in Gram-Negative Bacteria. *ACS Infect Dis*, 4(2): 84-87.
- Carreer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(8): 2950-2954.
- Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. (2011). 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*, 55(3): 1274-1278.
- Ceccarelli D, Essen-Zandbergen AV, Veldman KT, Tafro N, Haenen O, Mevius DJ. (2017). Chromosome-Based blaOXA-48-Like Variants in *Shewanella* Species Isolates from Food-Producing Animals, Fish, and the Aquatic Environment. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(2): e01013-16.
- Chan, M. [陳明恩]. (2012). Rapid diagnosis of isoniazid resistant mycobacterium tuberculosis by high resolution melting (HRM) assay. (Thesis). University of Hong Kong, Master of Medical Sciences, Pokfulam, Hong Kong SAR.

- Charfi K, Mansour W, Khalifa ABH, Mastouri M, Aouni M, Mammeri H. (2015). Emergence of OXA-204 β -lactamase in Tunisia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 82(4): 314-317.
- Christensen SC, Korner B. (1972). An endemic caused by multiresistant *Klebsiella* in an urological unit. *Scand J Urol Nephrol*, 6(3): 232-238.
- Ciurana B, Toma's JM. (1987). Role of lipopolysaccharide and complement in susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to nonimmune serum. *Infect Immun*, 55(11): 2741-2746.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests. 13th ed. CLSI standard M02. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- Çiftci İH, Karakeçe E, Aşık G, Demiray T, Er H. (2013). "Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında OXA-48 ve KPC Varlığının Araştırılması", *ANKEM Derg*, 27(2): 49-54.
- Dabos L, Bogaerts P, Bonnin R, Iorga B, Glupczynski Y, Thierry Naas T. (2017)b. Genetic and biochemical characterization of OXA-519, a novel OXA-48-like β -lactamase. In: Abstracts of the Twenty-seventh European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 2017. Abstract P0232. ESCMID, Basel, Switzerland.
- Dabos L, Bogaerts P, Peyrat A, Bonnin R, Iorga B, Glupczynski Y, Naas T. (2017)a. OXA-517, an extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-hydrolysing OXA-48-like variant. In: Abstracts of the Twenty-seventh European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 2017. Abstract P0234. ESCMID, Basel, Switzerland.
- Dabos L, Jousset A, Potron A, Dortet L, Iorga B, Bonnin T, Naas T. (2017)c. Genetic and biochemical characterization of OXA-535, a novel OXA-48-like enzyme progenitor of OXA-436 from *Shewanella bicestria* In: Abstracts of the Twenty-seventh European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Vienna, Austria, 2017. Abstract P0233. ESCMID, Basel, Switzerland.

- Davis TJ, Matsen JM. (1974). Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. *J Infect Dis*, 130(4): 402-405.
- Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. (2012). Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7): 1660-1665.
- Doi Y, O'Hara JA, Lando JF, Query AM, Townsend BM, Pasculle AW, Muto CA. (2014). Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. *Emerg Infect Dis*, 20(1): 163-165.
- Dortet L, Oueslati S, Jeannot K, Tandé D, Naas T, Nordmann P. (2015). Genetic and Biochemical Characterization of OXA-405, an OXA-48-Type Extended-Spectrum β -Lactamase without Significant Carbapenemase Activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(7): 3823-3828.
- Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. (2001). Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornitholytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 51(3): 925-932.
- Drawz SM, Bonomo RA. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1): 160-201.
- Edwards PR, Ewing WH. (1986). *Identification of Enterobacteriaceae*, 4th ed. Burgess Publishing Co., Minneapolis.
- El Gamal ML, Oh CH. (2010). Current status of carbapenem antibiotics. *Current Topics in Medical Chemistry*, 10(18): 1882-1897.
- Erali M, Voelkerding KV, Wittwer CT. (2008). High resolution melting applications for clinical laboratory medicine. *Exp Mol Pathol*, 85(1): 50-58.
- EUCAST breakpoint table Version 5.0 (valid from 2017-01-01) available. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing.
- EUCAST breakpoint table Version 8.1 (valid from 2018-05-15) available. Interpretation of MICs and zone diameters.

- Falagas ME, Grammatikos AP, Michalopoulos A. (2008). Potential of old-generation antibiotics to address current need for new antibiotics. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6: 593-600.
- Farrar JS, Reed GH, Wittwer CT. (2009). High resolution melting curve analysis for molecular diagnostics. In: Patrinos GP, Ansorge W, editors. *Molecular Diagnostics*, 2nd Ed. Burlington: Elsevier, in press.
- Fattouha R, Tijet N, McGeera A, Poutanena SM, Melanoa RG, Samir N. Patel SN. (2016). What Is the Appropriate Meropenem MIC for Screening of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Low-Prevalence Settings?. *Antimicrob. Agents Chemother*, 60(3): 1556-1559.
- Ferragut C, Izard D, Gavini F, Kersters K, De Ley J, Leclerc H. (1983). *Klebsiella trevisanii*: a new species from water and soil. *Int J Syst Bacteriol*, 33(2): 133-142.
- Gavini F, Leclerc H, Lefe`bvre B, Ferragut C, Izard D. (1977). Etude taxonomique d'ente´robacte´ries appartenant ou apparente´es au genre *Klebsiella*. *Ann Microbiol (Inst Pasteur)*, 128B: 45-49.
- Girault G, Wattiau P, Saqib M, Martin B, Vorimore F, Singha H, Engelsma M, Roest HJ, Spicic S, Grunow R, Vicari N, De Keersmaecker SCJ, Roosens NHC, Fabbri M, Tripathi BN, Zientara S, Madani N, Laroucau K. (2018). High-resolution melting PCR analysis for rapid genotyping of *Burkholderia mallei*. *Infect Genet Evol*, 63: 1-4.
- Girlich D, Poirel L, Nordmann P. (2012). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, 50(2): 477-479.
- Gomez S, Pasteran F, Faccone D, Bettiol M, Veliz O, De Belder D, Rapoport M, Gatti B, Petroni A, Corso A. (2013). Inpatient emergence of OXA-247: a novel carbapenemase found in a patient previously infected with OXA-163-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect*, 19(5): 233-235.
- Grice EA, Segre JA. (2011). The skin microbiome. *Nature reviews Microbiology*, 9(4): 244-253.

- Griffiths E. (1987). The iron-uptake systems of pathogenic bacteria, In J. J. Bullen and E. Griffiths (ed.), Iron and infection. John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 69- 137.
- Gulmez D, Woodford N, Palepou MFI, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. (2008). Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. International Journal of Antimicrobial Agents, 31(6): 523-526.
- Gür D. β -laktamazlar. (2002). Hacettepe Tıp Dergisi, 33: 102-109.
- Hemarajata P, Yang S, Hindler JA, Humphries RM. (2015). Development of a Novel Real-Time PCR Assay with High-Resolution Melt Analysis To Detect and Differentiate OXA-48-Like β -Lactamases in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother, 59(9): 5574-5580.
- Herrmann MG, Durtschi JD, Bromley LK, Wittwer CT, Voelkerding KV. (2006). Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: crossplatform comparison of instruments and dyes. Clin Chem, 52(3): 494-503.
- Hirsch EB, Chang KT, Zucchi PC, Francoeur DN, Ledesma KR, Tamb VH, Lasco TM. (2014). An evaluation of multiple phenotypic screening methods for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae. Journal of Infection and Chemotherapy, 20(3): 224-227.
- Hong T, Smith Moland E, Abdalhamid B, Hanson ND, Wang J, Sloan C, Fabian D, Farajallah A, Levine J, Thomson KS. (2005). *Escherichia coli*; development of carbapenem resistance during therapy. Clin Infect Dis, 40(10): 84-86.
- Horan T, Culver D, Jarvis W, Emori G, Banerjee S, Martone W, Thornsberry C. (1988). Pathogens causing nosocomial infections. Antimicrobic Newsl, 5(9): 65-67.
- Izard D, Ferragut C, Gavini F, Kersters K, Ley JD, Leclerc H. (1981). *Klebsiella terrigena*, a new species from soil and water. Int J Syst Bacteriol, 31(2): 116-127.

- Jeong SH, Kim HS, Kim JS, Shin DH, Kim HS, Park MJ, Shin S, Hong JS, Lee SS, Song W. (2016). Prevalence and Molecular Characteristics of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae From Five Hospitals in Korea. *Ann Lab Med*, 36(6): 529-535.
- Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. (2005). Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo-beta- lactamase production in clinical isolates. *Indian J Med Res*, 121(6): 780-783.
- Jin D, Luo Y, Zhang Z, Fang W, Ye J, Wu F, Ding G. (2012). Rapid molecular identification of *Listeria* species by use of real-time PCR and high-resolution melting analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 330: 72-80.
- Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1): 54-75.
- Jones GW, Isaacson RE. (1983). Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit Rev Microbiol*, 10(3): 229-260.
- Kaase M, Szabados F, Wassill L, Gatermann SG. (2012). Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a commercial multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 50(9): 3115-3118.
- Karabay O, Altindis M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir OA, Erdem AF. (2016). The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 15: 6-12.
- Kasap M, Torol S, Kolayli F, Dundar D, Vahaboglu H. (2013). OXA 162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 28(5): 990-996.
- Khimji PL, Miles AA. (1978). Microbial iron-chelators and their action on *Klebsiella* infections in the skin of guinea-pigs. *Br J Exp Pathol*, 59(2): 137-147.
- Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC. (2011). Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci*, 41(2): 161-166.

- Kimathi RK. (2016). Detection of Salmonella Species in Kenya Using 16s rRNA PCR Coupled to High Resolution Melting Point Assay (HRMA). (Thesis). University of Nairobi, Kenya.
- Konaklieva MI. (2014). Molecular Targets of β -Lactam-Based Antimicrobials: Beyond the Usual Suspects. *Antibiotics*, 3(2): 128-142.
- Kong K, Schneper L, Mathee K. (2010). Beta-Lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. *Acta Pathologica, Microbiologica Et Immunologica Scandinavica*, 118(1): 1-36.
- Leclercq R, Cantón R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 19(2): 141-160.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. (2001). Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*, 7(2): 88-91.
- Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. (2004). Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem*, 50(7): 1156-1164.
- Livermore DM, Woodford N. (2006). The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*, 14(9): 413-420.
- Lutgring JD, Zhu W, de Man T, Avillan JJ, Anderson KF, Lonsway DR, Rowe LA, Batra D, Rasheed JK, Limbago BM. (2018). Phenotypic and Genotypic Characterization of *Enterobacteriaceae* Producing Oxacillinase-48-Like Carbapenemases, United States. *Emerg Infect Dis*, 24(4): 700-709.
- Lyman M, Walters M, Lonsway D, Rasheed K, Limbago B, Kallen A. (2015). Notes from the Field: Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* Producing OXA-48-like Carbapenemases United States, 2010-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 64(47): 1315-1316.

- Lynch JP, Clark NM, Zhanel GG. (2013). Evolution of antimicrobial resistance among *Enterobacteriaceae* (focus on extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases). *Expert Opinion Pharmacotherapy*, 14(2): 199-210.
- Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. (2018). OXA-48-like carbapenemases producing *Enterobacteriaceae* in different niches. *European Journal of Clinical Microbiology*, 37(4): 587-604.
- Marchaim D, Perez F, Lee J, Bheemreddy S, Hujer AM, Rudin S, Hayakawa K, Lephart PR, Blunden C, Shango M, Campbell ML, Varkey J, Manickam P, Patel D, Pogue JM, Chopra T, Martin ET, Dhar S, Bonomo RA, Kaye KS. (2012). "Swimming in resistance": Co-colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* or *Pseudomonas aeruginosa*. *American Journal of Infection Control*, 40(9): 1-6.
- Martin RM, Bachman MA. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*, 22(8): 4-19.
- Medeiros AA. (1993). Nosocomial outbreaks of multiresistant bacteria-extended-spectrum beta-lactamases have arrived in North America. *Ann Intern Med*, 119(5): 428-430.
- Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. (1992). Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*, 60(6): 2529-2535.
- Montgomery J, Wittwer CT, Palais R, Zhou L. (2007). Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis. *Nature Protocols*, 2(1): 59-66.
- Mori M, Ohta M, Agata N, Kido N, Arakawa Y, Ito H, Komatsu T, Kato N. (1989). Identification of species and capsular types of *Klebsiella* clinical isolates, with special reference to *Klebsiella planticola*. *Microbiol Immunol*, 33(11): 887-895.
- Mulvey MR, Simor AE. (2009). Antimicrobial Resistance in Hospitals: How Concerned Should We Be? *Canadian Medical Association Journal*, 180(4): 419-415.
- Mushtaq S, Ge Y, Livermore DM. (2004). Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter spp.*

- with characterized beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(4): 1313-1319.
- Nayak R, Call V, Kaldhone P, Tyler C, Anderson G, Phillips S, Kerdahi K, Foley SL. (2007). Comparison of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg Susceptibility Testing Results. *Clin Med Res*, 5(2): 98-105.
- Nazik H, Poirel L, Nordmann P. (2005). Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(5): 2146-2147.
- Noor N, Ajaz M, Rasool SA, Pirzada ZA. (2004). Urinary tract infections associated with multidrug resistant enteric bacilli: characterization and genetical studies. *Pak J Pharm Sci*, 17(2): 115-23.
- Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, the European Network on Carbapenemases. (2012). Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect*, 18(5): 432-438.
- Nordmann P, Naas T, Poirel L. (2011). Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*, 17(10): 1791-1798.
- Nordmann P, Poirel L. (2014). The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*, 20(9): 821-830.
- Octavia S, Lan R. (2014). The Family *Enterobacteriaceae*. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, Berlin.
- Ofek I, Doyle RJ. (1994). *Bacterial adhesion to cells and tissues*. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.
- Opal S, Cross A, Gemski P. (1982). K antigen and serum sensitivity of rough *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1982; 37(3): 956-960.
- Ørskov I, Ørskov F. (1984). Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol*, 14: 143-164.

- Oteo J, Hernández JM, Espasa M, Fleites A, Sáez D, Bautista V, Pérez-Vázquez M, Fernández-García MD, Delgado-Iribarren A, Sánchez-Romero I, García-Picazo L, Miguel MD, Solís S, Aznar E, Trujillo G, Mediavilla C, Fontanals D, Rojo S, Vindel A, Campos J. (2013). Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother*, 68(2): 317-321.
- Ouertani R, Ben Jomàa-Jemili M, Gharsa H, Limelette A, Guillard T, Brasme L, de Champs C, Chouchani C. (2018). Prevalence of a New Variant OXA-204 and OXA-48 Carbapenemases Plasmids Encoded in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Tunisia. *Microb Drug Resist*, 24(2): 142-149.
- Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. (2015). Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β -lactamases. *J Antimicrob Chemother*, 70: 1059-1063.
- Patel G, Bonomo RA. (2013). “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*, 4(48):1-17.
- Paterson DL. (2006). Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med*, 119(6 Suppl 1): 20-28;
- Pfeifer Y, Matten J, Rabsch W. (2009). *Salmonella enterica* serovar Typhi with CTX-M β -lactamase, Germany. *Emerg Infect Dis*, 15(9): 1533-1535.
- Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(10): 5873-5884.
- Podschun R, Penner I, Ullmann U. (1992)b. Interaction of *Klebsiella* capsule type 7 with human polymorphonuclear leucocytes. *Microb Pathog*, 13(5): 371-379.
- Podschun R, Ullmann U. (1992)a. Isolation of *Klebsiella terrigena* from clinical specimens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 11(4): 349-352.
- Podschun R, Ullmann U. (1992)c. *Klebsiella* capsular type K7 in relation to toxicity, susceptibility to phagocytosis and resistance to serum. *J Med Microbiol*, 36(1992): 250-254.

- Podschun R, Ullmann U. (1998). *Klebsiella spp.* as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clin Microbiol Rev, 11(4): 589-603.
- Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. (2012). Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. Antimicrob Agents Chemother, 56(1): 559-562.
- Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. (2011). OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother, 55(6): 2546-2551.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother, 48(1): 15-22.
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. (2010). Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 54(1): 24-38.
- Poirel L, Potron A, Nordmann P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother, 67(7): 1597-1606.
- Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis, 70(1): 119-123.
- Pollack M, Niemann RE, Reinhardt JA, Charache P, Jett MP, Hardy PH, Jr. (1972). Factors influencing colonisation and antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. Lancet 1972; ii: 668-671.
- Pollett S, Miller S, Hindler J, Uslan D, Carvalho M, Humphries RM. (2014). Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. J Clin Microbiol, 52(11): 4003-4009.

- Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. (2011). Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(10): 4896-4899.
- Potron A, Nordmann P, Poirel L. (2013). Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 57(1): 633-636.
- Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*, 18(31): pii=20549.
- Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S, Nordmann P. (2013). Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*, 41(4): 325-329.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA. (2008). *Microbiology*, 5th ed., McGraw-Hill, New York, p. 489-493.
- Queenan AM, Bush K. (2007). Carbapenemases: The Versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2(3): 450-458.
- Rawat D, Nair D. (2010). Extended-spectrum β -Lactamases in Gram-Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Disease*, 2(3): 263-274.
- Reed GH, Wittwer CT. (2004). Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis. *Clin Chem*, 50(10): 1748-1754.
- Rosebury T. (1962). *Microorganisms indigenous to man*. McGraw Hill Book Co., New York.
- Roth AL, Hanson ND. (2013). Rapid Detection and Statistical Differentiation of KPC Gene Variants in Gram-Negative Pathogens by Use of High-Resolution Melting and Screen Clust Analyses. *J Clin Microbiol*, 51(1): 61-65.

- Ruppé É, Woerther P-L, Barbier F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, 5: 21.
- Sakazaki R, Tamura K, Kosako Y, Yoshizaki E. (1989). *Klebsiella ornithinolytica* sp. nov., formerly known as ornithine-positive *Klebsiella oxytoca*. *Curr Microbiol*, 18(4): 201-206.
- Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochévis LC, Barth AL, Zavascki AP. (2014). Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(6): 3566-3567.
- Samuelsen Ø, Hansen F, Aasnæs B, Hasman H, Lund BA, Leiros HS, Lilje B, Janice J, Jakobsen L, Littauer P, Søes LM, Holzknecht BJ, Andersen LP, Stegger M, Andersen PS, Hammerum AM. (2017). Dissemination and Characteristics of a Novel Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing Class D β -Lactamase, OXA-436, Found in Isolates from Four Patients at Six Different Hospitals in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(1): e01260-17.
- Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. (1991). Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med*, 91(3): 72-75.
- Seipp MT, Durtschi JD, Liew MA, Williams J, Damjanovich K, Pont-Kingdon G, Lyon E, Voelkerding KV, Wittwer CT. (2007). Unlabeled oligonucleotides as internal temperature controls for genotyping by amplicon melting. *J Mol Diagn*, 9(3): 284-289.
- Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. (2014). Early-Onset Neonatal Sepsis. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(1): 21-47.
- Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught JJ, Kanis IYR, MacLaren DM. (1985). Chemiluminescence of human leucocytes stimulated by clinical isolates of *Klebsiella*. *J Med Microbiol*, 19(3): 333-338.
- Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught JJ, MacLaren DM. (1986). The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J Med Microbiol*, 21(1986): 133-137.


- Thaden JT, Pogue JM, Kaye KS. (2017). Role of newer and re-emerging older agents in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, 8(4): 403-416.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 4.0, 2014.
- Torres-González P, Ortiz-Brizuela E, Cervera-Hernandez ME, Bobadilla-Del Valle M, Martínez-Gamboa A, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon A. (2016). Associated Factors and Outcomes for OXA-232 Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections in a Tertiary Care Centre in Mexico City: A Case-Control-Control Study. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 86(2): 243-248.
- Ullmann U. (1986). Pattern of microbial isolates in hospitalized patients. *Zentbl Bakteriol Mikrobiol Hyg Ser*, 183(1986): 103-113.
- Vading M, Naucmér P, Kalin M, Giske CG. (2018). Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *PLoS One*, 13(4): e0195258.
- van der Stoep N, van Paridon CDM, Janssens T, Krenkova P, Stambergova A, Macek M, Matthijs G, Bakker E. (2009). Diagnostic guidelines for high resolution melting curve analysis: an interlaboratory validation of BRCA1 mutation scanning using the 96-well LightScanner (IT). *Hum Mutat*, 30(6): 899-909.
- Voulgari E, Poulou A, Dimitroulia E, Politi L, Ranellou K, Gennimata V, Markou F, Pournaras S, Tsakris A. (2016). Emergence of OXA-162 Carbapenemase- and DHA-1 AmpC Cephalosporinase-Producing Sequence Type 11 *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Onset Infection in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3): 1862-1864.
- Walsh TR. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3): 8-14.
- Westbrook GL, O'Hara CM, Roman SB, Miller JM. (2000). Incidence and Identification of *Klebsiella planticola* in Clinical Isolates with Emphasis on Newborns. *J Clin Microbiol*, 38(4): 1495-1497.


- Williams P, Lambert PA, Brown MRW, Jones RJ. (1983). The role of the O and K antigens in determining the resistance of *Klebsiella aerogenes* to serum killing and phagocytosis. *J Gen Microbiol*, 129(7): 2181-2191.
- Woksepp H, Ryberg A, Billström H, Hällgren A, Nilsson LE, Marklund BI, Olsson-Liljequist B, Schön T. (2014). Evaluation of High-Resolution Melting Curve Analysis of Ligation-Mediated Real-Time PCR, a Rapid Method for Epidemiological Typing of ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and Enterobacter Species) Pathogens. *J Clin Microbiol*, 52(12): 4339-4342.
- Wolff BJ, Thacker WL, Schwartz SB, Winchell JM. (2008). Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother*, 52: 3542-3549.
- Yinnon AM, Butnaru A, Raveh D, Jerassy Z, Rudensky B. (1996). *Klebsiella* bacteremia: community versus nosocomial infection. *Monthly J Assoc Physicians*, 89: 933-941.
- Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *Journal of Infections in Developing Countries*, 3(5): 335-341.
- Zavascki AP, Goldani LZ, Li J, Nation RL. (2007). Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. *J Antimicrob Chemother*, 60(6): 1206-1215.
- Zee AVD, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, van der Zanden AG, Te Witt R, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Cohen Stuart J, Ossewaarde JM. (2014). Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infectious Diseases*, 14(2018): 27-31.

EKLER

Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 31/10/2016-E.14744





T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı : 71522473/050.01.04/ **183**
Konu : Girişimsel Olmayan Etik Kurul
Başvuru Dosyası Hk.

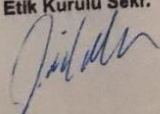
Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 27.09.2016 tarihli 174 sayılı (düzeltme) başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Karbapenemaz Üreten *Klebsiella spp.* Suşlarında OXA-48-like Genlerinin Araştırılması" isimli çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.





Prof.Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER
Etik Kurulu Başkanı

Yücel DEMİR
Etik Kurulu Sekr.


Güvenli Elektronik
İmzalı Aslı ile Aynıdır.
31.10.2016.

Evrakı Doğrulamak İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelegeDogrulama.aspx?V=BELM3724A>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu, Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Dekanlığı, Korucuk Kampüsü, Korucuk, Adapazarı/Sakarya
Tel:264 295 6630 Faks:264 295 6629
E-Posta: Tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ağ: www.tip.sakarya.edu.tr



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Elmas Pınar KAHRAMAN
Doğum yeri ve tarihi : SAKARYA / 05 Nisan 1994
Uyruğu : TC
Medeni durumu :Bekar
Askerlik durumu : -
İletişim adresi :elmaspnar11@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi

Derece	Mezun Olduğu Kurum	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü	
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2015
Önlisans	Anadolu Üniversitesi, Sağlık Kurumları İşletmeciliği	2015
Lise	Sakarya Hacı Zehra Akkoç Kız Lisesi	2011

III- Ünvanları

IV- Mesleki Deneyimi

Ünvanı	Çalıştığı Kurum	Çalışma Yılı
Laboratuvar Sorumlusu	ÖZ-KAR İnşaat Gıda Nakliyat AŞ. REVAN Su Fabrikası	2016-2017

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları: (Ulusal ya da uluslararası makale, bildiri, poster, kitap/kitap bölümü vb.)

Makaleler:

Kahraman EP, Karakeçe E, Erdoğan F, Uluçurt H, Köroğlu M, Çiftci İH. (2017). *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumlarının değerlendirilmesi. Ortadoğu Medical Journal, 9(1): 12-18.

Kahraman EP, Çiftci İH. (2017). The Antibiotic Resistance Patterns of *Klebsiella pneumoniae* Clinic Isolates: A Comprehensive Meta-Analysis. Open J Bac, 1(1): 21-26.

Sözlü bildiriler:

Kahraman EP, Aydemir Ö, Toptan H, Kılıç Ü, Köroğlu M, Altındış M. *Klebsiella pneumoniae* suşlarının karbapenem duyarlılığının sıvı mikrodilüsyon ve otomatize sistem ile araştırılması. 2. Güneydoğu Anadolu İnfeksiyon Günleri Sempozyumu, 3-6 Mayıs 2018, Diyarbakır, S-09.

Posterler:

Kahraman EP, Çiftci İH. *Klebsiella pneumoniae*'nin Aminoglikozid Grubu Antibiyotiklere Direnci.12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Sempozyum Kitabı, Askeri Müze-Harbiye/İstanbul, 1-3 Nisan/April 2016: P-102.

Kahraman EP, Çiftci İH. *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Paternleri. 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri Sempozyum Kitabı, Askeri Müze-Harbiye/İstanbul, 1-3 Nisan/April 2016: P-103.

Kahraman EP, Çiftci İH. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretme ve çeşitli antibiyotiklere direnç oranları. İnfeksiyon Dünyası Çalıştay Kitabı 24 Mart/March 2016: P-006, S-34.

Kahraman EP. Mikroskopik Görüntülemeye Oluşan Artefaktlar. Sakarya Medical Journal II. Ulusal Tıp Kongresi "Geleceğin Tıbbı" Özel Sayısı Cilt/Vol:5 Sayı/Issue:3 Eylül/September:2015, S-47.

Kahraman EP. Ülkemizde Parazitlerin Kontaminasyonunda Etkili Olan Sosyolojik Faktörler. Sakarya Medical Journal II.Ulusal Tıp Kongresi "Geleceğin Tıbbı" Özel Sayısı Cilt/Vol:5 Sayı/Issue:3 Eylül/September:2015, S-46.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

VIII- Diğer Bilgiler

Mikrobiyota, Probiyotikler ve Akılcı Beslenme Sempozyumu, 9 Mayıs 2018, Üniversitesi Kültür ve Kongre Merkezi, Sakarya - Kongre Sekreteryası

Sağlık Bilimlerinde Proje Yazma Eğitimi / ADAPTTTO - 16 Mart-6 Nisan 2016

Win Win Eğitim / N.L.P.(Nöro Linguistik Programlama) Eğitimi - 29 Nisan 2012

Win Win Eğitim / Beden Dili, Etkili İletişim, Mülakat Teknikleri, Motivasyon Mektubu ve CV Hazırlama Eğitimi - 1 Nisan 2012

TÜBİTAK Liseler Arası Matematik Olimpiyatları 2011- Lise temsilcisi