

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KARBAPENEME DİRENÇLİ
KLEBSIELLA PNEUMONIAE
SUŞLARINDA DİRENÇ
GENLERİNİN BELİRLENMESİ VE
DİRENÇ PLAZMİTLERİNİN PCR
TEMELLİ REPLİKON
TİPLENDİRMESİ**

UZMANLIK TEZİ

DR.FATMA ERDEM

DANIŞMAN
PROF.DR.ZERRİN AKTAŞ

İSTANBUL-2016

TEZ ONAYI

(Bu sayfa yerine, başarılı geçen Tez Sınavı sonrası sınav tutanağı ekinde yer alan Tez Onay sayfası gelecektir.)



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Fatma ERDEM

İTHAF

Her zaman bana destek olan aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tıpta uzmanlık eğitimim sırasında her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen Ana Bilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN'a teşekkür ederim.

Tıpta Uzmanlık Eğitimim boyunca azmi, kararlılığı, başarıları ve bilgisi ile rol model aldığım, her konuda beni motive eden, desteğini hiç esirgemeyen çok değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ'a, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemde emeği geçen Prof. Dr. Selim BADUR, Prof. Dr. Bülent GÜRLER, Prof. Dr. Şengül DERBENTLİ, Prof. Dr. Nezahat GÜRLER, Prof. Dr. Yıldız YEĞENOĞLU, Prof. Dr. O. Şadi YENEN, , Prof. Dr. Ali ÖNER, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Prof. Dr. Zeynep Çiğdem KAYACAN, Prof. Dr. M.Derya AYDIN, Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Zayre ERTURAN, Prof. Dr. Özden BORAL BÜYÜKBABA, Doç. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU ve Doç. Dr. Gülseren AKTAŞ'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Dostluklarını ve yardımlarını esirgemeyen mikrobiyoloji laboratuvarının tüm çalışanlarına sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Istituto Superiore Di Sanita, Roma, İtalya'da plazmit analizi deneylerinin bir kısmını yaptığım ve bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Prof.Dr. Alessandra Caratolli'ye, tez projem sırasında desteğinden dolayı Prof. Dr. Oral ÖNCÜL'e, tam genom dizi analizindeki yardımlarından dolayı Dr. Alper KARAGÖZ'e teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Tıpta Uzmanlık eğitimim sırasında sabır gösteren, desteklerini hiç esirgemeyen, varlıklarıyla beni motive eden, birlikte olmamız gereken zamanlardan feragatta bulunan sevgili oğlum Yiğit ve eşim Ziya'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2379 proje no ile desteklenmiştir. Sağladığı destekten dolayı BAP birimine teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİ
ÖZET	Xİİİ
ABSTRACT.....	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Morfolojik Özellikleri ve Oluşturduğu İnfeksiyonlar..	3
2.2. <i>K. pneumoniae</i> 'nin Epidemiyolojik Olarak Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Tiplendirme Yöntemleri	4
2.2.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....	4
2.2.2. Multi Lokus Sekans Tiplendirme Yöntemi (MLST)	4
2.2.3. Ribotiplendirme	4
2.2.4. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD).....	4
2.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP).....	4
2.2.6. Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (REP-PCR).....	5
2.2.7. Tam Genom Dizi (WHO) Analizi.....	5
2.3. <i>K. pneumoniae</i> 'da Saptanan Plazmitler	6
2.3.1. Plazmitlerin Sınıflandırılması	7
2.3.2. Plazmitlerin Tanısı ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler	8
2.3.2.1. Plazmitlerin dizi analiziyle tanımlanması	8
2.3.2.2. Plazmit Multilokus Sekans Tiplendirme Yöntemi (pMLST).....	9
2.3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Plazmit Replikon Tiplendirmesi (PBRT)	9
2.4. <i>K. pneumoniae</i> 'da Antimikrobiyallere Direnç	10
2.4.1. Beta laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç	10

2.4.2. Karbapenem Grubu Antibiyotiklere Direnç.....	11
2.5. Karbapenemaz Enzimlerinin Sınıflandırılması, Epidemiyoloji, Moleküler özellikleri, Tedavi Seçenekleri ve Tanı Yöntemleri	13
2.5.1. Sınıf A Karbapenemazların Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri.....	13
2.5.2. Sınıf B Karbapenemazların (Metallo beta laktamazlar) Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri	15
2.5.3. Sınıf D Karbapenemazların (Oksasilinazlar) Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri	17
2.5.4. Sınıf C Karbapenemazlar	18
2.6. Karbapenemazların Tanımlamasında Kullanılan Güncel Tanı Yöntemleri.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri	20
3.1.1. Bakteri tanımlaması	20
3.2. Fenotipik Yöntemler	21
3.2.1. Modifiye Hodge Testi (MHT).....	21
3.2.2. Boronik Asit Çift Disk Sinerji Testi	21
3.2.3. Gradient Test Yöntemi ile Metallo Beta Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	22
3.3. Bakteri DNA'sı ekstraksiyonu	22
3.3.1. Kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonu	22
3.3.2. Kit ile Genomik DNA ekstraksiyonu (Wizard Genomik DNA purifikasyon kit ,Promega)	22
3.3.3. Kit ile Plazmit DNA ekstraksiyonu (High pure Plazmid Alter Midi Prep (Invitrogen)).....	23
3.4. Agaroz jelin Hazırlanması	23
3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR).....	24
3.4.1.1. PZR ile Sınıf D Karbapenemaz (OXA-23, OXA24, OXA51, OXA-58 ve OXA-48) ve Sınıf A Karbapenemaz (KPC ve GES) Genlerinin Belirlenmesi.....	24
3.4.1.2. PZR ile Sınıf B Metallo Beta Laktamazların Saptanması.....	25
3.4.1.3. PZR ile CTXM ve TEM, SHV Grubu Beta Laktamazların saptanması	26
3.4.1.4. Plazmit kaynaklı Amp C genlerinin PZR yöntemi ile araştırılması.....	27
3.4.1.5. PBRT (PZR Temelli Replikon Tiplendirmesi)	28
3.4.1.6. Plazmit Replikonlarının Simpleks PZR ile Araştırılması	29
3.4.1.7. Plazmit Transformasyon Deneyi.....	31

3.5. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) Yöntemi.....	32
3.5.1. 1 M Tris Tamponu:	32
3.5.2. 1 M Tris-HCl Tamponu	32
3.5.3. Bakteri Süspansiyon Tamponu (CSB)	32
3.5.4. Lizis Tamponu hazırlanışı.....	32
3.5.5. PFGE için agaroz plaklarının hazırlanması	32
3.5.6. PFGE için elektroforezin uygulanması	34
3.5.7. PFGE sonuçlarının değerlendirilmesi	34
3.6. Tam Genom Dizi Analizi.....	34
3.7. Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) Yöntemi.....	34
4. BULGULAR.....	36
4.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri Sonuçları.....	36
4.2. PZR Yöntemi Sonuçları	47
4.3. Plazmit Analizi Sonuçları	48
4.4. PFGE Sonuçları	52
4.5. Tam Genom Analizi ve MLST Sonuçları	54
5. TARTIŞMA	56
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	72

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Moleküler tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması	6
Tablo 2: Karbapenemaz genlerini taşıyan ve tam genom dizi analizi yapılmış enterik bakterilerde bulunan plazmitler (13).....	8
Tablo 3: Polimeraz zincir reaksiyonu temelli plazmit replikon tiplendirmesinde kullanılan replikonlar (28, 30, 31).	10
Tablo 4: Sınıf A ve Sınıf D karbapenemaz genlerinin tespitinde kullanılan primerler:	25
Tablo 5: Metallo beta laktamaz tespitinde kullanılan primerler	26
Tablo 6: CTXM grubu beta laktamazların tesbitinde kullanılan primer dizileri	27
Tablo 7: Plazmit kaynaklı Amp C genlerinin tespitinde kullanılan primerler.....	28
Tablo 8: Plazmit analizinde kullanılan primerler (28).....	30
Tablo 9: Plazmit analizinde kullanılan pozitif kontrol suşlar	31
Tablo 10: <i>Klebsiella pneumoniae</i> MLST analizi için kullanılan primerler (9).	35
Tablo 11: OXA-48 geni taşıyan <i>K. pneumoniae</i> suşlarının (n=43) disk difüzyon duyarlılık deneyleri sonuçları	38
Tablo 12: Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması.....	39
Tablo 13: Karbapeneme dirençli <i>K. pneumoniae</i> suşlarının (n=50) karbapenemler için kümülatif MİK değerleri.	40
Tablo 14: <i>K. pneumoniae</i> suşlarının karbapenemler için MİK (mg/L) değerleri	41
Tablo 15: OXA-48 ve NDM pozitif izolatların karbapenem direnç oranlarının karşılaştırılması.....	42
Tablo 16. <i>K. pneumoniae</i> (n=50) suşlarında bulunan direnç genleri, replikon tipleri ve PFGE profilleri.	51

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Karbapenem direcinden sorumlu mekanizmaların şematik gösterimi	12
Şekil 2: Karbapenemlere dirençli <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının Avrupa ülkelerindeki sıklık dağılımı ECDC verileri (38).	13
Şekil 3: KPC tipi karbapenemazların coğrafik dağılımı.	14
Şekil 4: Tn4401b Naas et all. (46).	15
Şekil 5: NDM Tipi Karbapenemazların Coğrafik Dağılımı (42).	16
Şekil 6: OXA-48 tip karbapenemazların coğrafik dağılımı (42).	17
Şekil 7: Replikonları karışımlara göre dağılımı ve amplikon uzunlukları.....	29
Şekil 8: OXA-48 pozitif <i>K. pneumoniae</i> (n=43) suşlarının antibiyotik disk difüzyon deneyleri sonuçları	37
Şekil 9: NDM pozitif <i>K. pneumoniae</i> (n=7) suşlarının antibiyotik disk difüzyon deneyleri sonuçları	37
Şekil 10: A; Tüm <i>K. pneumoniae</i> suşlarının (n=50) MİK (mg/L) sonuçları.	42
Şekil 11: <i>K.pneumoniae</i> (7 nol'u suş) suşunda GSBL pozitif çift disk sinerji testi sonucu örneği.	44
Şekil 12: <i>K.pneumoniae</i> (55 no'lu suş) GSBL negatif çift disk sinerji testi sonucu örneği.	44
Şekil 13: <i>K.pneumoniae</i> suşlarında (22, 23, 24,2 5, 26 nolu'lu suşlar) pozitif Modifiye hodge testi sonuçları örneği.	45
Şekil 14: <i>K.pneumoniae</i> suşlarında (3 ve 5 no'lu suşlar) pozitif Boronik asit çift disk sinerji testi sonucu örneği.	46
Şekil 15: <i>K.pneumoniae</i> (70 no'lu suş) suşunda MBL E test (IMP/IP-EDTA) ile negatif test sonucu örneği.	46
Şekil 16: PZR yöntemi ile OXA-48 pozitif <i>K.pneumoniae</i> suşlarının amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki bant görüntüleri, Sütun 1; M: Marker ϕ X174 Hae III. Sütun 2: pozitif kontrol, sütun 3: negative kontrol, sütun 4, 5, 6, 12, 13, 15: 19, 44, 66, 75, 76, 78 nolu OXA-48 pozitif suşlar.....	47
Şekil 17: PZR yöntemi ile CTXM-1 grubu pozitif amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri. Sütun 1: Marker, sütun 2: pozitif kontrol, sütun 3: negative kontrol, sütun 4, 6, 8, 9, 11, 16, 17, 18: CTXM-1 pozitif 5, 7, 15, 18, 19, 20, 23, 24 no'lu suşlar.	48

Şekil 18: Inc A/C tespitine yönelik yapılan simpleks PZR yöntemi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 2 agaroz jelde UV ışık altındaki bant görüntüleri. Sütun 1:Marker, ϕ X174 DNA Marker Hae III Digest, Sütun 2: Negatif kontrol, Sütun 3: Pozitif kontrol,sütun 6, 7, 10, 11: IncA/C pozitif suşlar.	48
Şekil 19: PBRT yöntemi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri. ...	49
Şekil 20. Transformant hücrelere ait OXA-48 PZR görüntüleri.	50
Şekil 21: <i>K. pneumoniae</i> suşlarının (n=50) PFGE sonuçları.	53
Şekil 22: NDM pozitif <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının PFGE görüntüleri	54
Şekil 23: 1 numaralı suşun blast analizi sonucu: Siyah çizgi : ISEcp1, OXA-181: 3 kopya, CTX-M-15: 1 kopya.....	55



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

ÇDS: Çift Disk Sinerji Testi

MBL: Metallo beta laktamaz

MHT: Modifiye Hodge Test

PBRT: PZR Based Replicon Typing

PFGE: Pulsed-Field Gel Electrophoresis

MLST: Multilocus Sequence Typing

GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz

FBA: Fenil Boronik Asit

WHO: Tam Genom Dizi Analizi

ÖZET

ERDEM F, Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında direnç genlerinin belirlenmesi ve direnç plazmitlerinin polimeraz zincir reaksiyonu temelli replikon tiplendirmesi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 2016

1500 yataklı İstanbul Tıp Fakültesi hastanesinde, 2012-2016 yılları arasında yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen ve disk difüzyon yöntemi ile ertapenem, meropenem veya imipenem dirençli bulunan toplam 50 *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya alındı.

Suşların antibiyotik duyarlılıkları başlangıçta disk difüzyon yöntemi ile CLSI kriterlerine uygun olarak araştırıldı. Karbapenem grubu antibiyotiklerin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri gradiyent test ve mikrodilüsyon yöntemleri ile belirlendi. Karbapenemaz aktivitesini saptamaya yönelik fenotipik yöntemlerden; çift disk sinerji testi (ÇDS), boronik asit çift disk sinerji testi, metallo beta laktamaz E test (MBL) ve modifiye hodge testi (MHT) uygulandı. Genotipik testlerde; antibiyotik direncinden sorumlu olan Sınıf A (KPC, GES), sınıf B (IMP, VIM, NDM, SPM ve SIM), sınıf D karbapenemazlardan OXA beta laktamaz genleri (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 ve OXA-48), CTX-M, TEM, SHV beta laktamazları ve kazanılmış AmpC beta laktamaz üretiminden sorumlu genler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneyleri ile araştırıldı. Plazmit tiplendirmesi polimeraz zincir reaksiyonu temelli replikon tiplendirmesi (PBRT) ile yapıldı. Suşlar arasındaki klonal ilişki Pulsed Field Jel Elektroforez (PFGE) yöntemi ile araştırıldı. Ayrıca kolistine dirençli bulunan bir suşa tam genom dizi analizi, plazmit dizi analizi ve Multi Lokus Sekans Tiplendirme (MLST) yöntemi uygulandı.

Karbapenemlerin MİK değerleri; ertapenem için 2- >32 mg/L, meropenem için 0.5 - >32 mg/L, imipenem için 0.5 - >32 mg/L ve doripenem için 0.5 ->32 mg/L arasında bulundu. *K. pneumoniae* izolatlarının %86 (n=43/50)'sı OXA-48 tipi karbapenemaz geni taşıırken, %14 (n=7/50)'ünde NDM tipi karbapenemaz varlığı tespit edildi. Araştırılan karbapenem direncinden sorumlu diğer genlerin varlığı saptanmadı. Suşların %62 (n=31)'sinde TEM, %78 (n=39)'inde SHV, %50 (n=25)'sinde CTXM-1, %10 (n=5)'inde CTXM-2 tipi beta- laktamaz saptandı. Suşların %42 (n=21)'sinde

CTXM -1 ve SHV, %56 (n=28)'sında TEM ve SHV, %38 (n=19)'inde CTXM-1 ve SHV, %36 (n=18)'sında TEM, SHV, CTXM-1, %10 (n=5)'nunda CTXM-1 ve CTXM-2 tipi beta laktamaz birlikte saptanmıştır. Bu çalışmada 66, 69, 76, 77 ve 78 no'lu suşlar, NDM veya OXA-48 genleriyle birlikte SHV, CTX-M-1 ve CTX-M-2 grubu direnç genlerini taşıyan hibrit suşlar olarak tanımlandılar. Suşların hiçbirinde multipleks PZR yöntemi ile plazmidik AmpC genleri (FOX, CIT, MOX, DHA, ACC, EBC) saptanmadı. Plazmit tiplendirme yöntemleri ile 50 izolatın %50 (n=25)'sinde IncR tipi replikon saptanırken, %40 (n=20)'ında IncA/C tipi replikon, %18(n=9)'nde IncFIIK tipi replikon bulunmuştur. On suş ise PBRT ile tiplendirilememiştir. Transformasyon deneyleri sonucunda OXA-48 geninin FIIK plazmiti üzerinde alıcı hücreye transfer edildiği tespit edilmiştir. R plazmitinin OXA-48 genini aktarmadığı gösterilmiştir. İzolatların PFGE sonuçlarına göre 10 farklı küme ve 46 farklı genotip saptandı. Baskın klon ya da salgın tespit edilmedi. D kümesinde iki suş, F kümesinde iki suş klonal olarak ilişkili bulundu. Bir numaralı suşa yapılan tam genom dizi analizi sonucunda *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 ile %100 benzer olduğu tespit edildi. Suşun OXA-181, CTXM-15, NDM, arr-3, aac(6')-Ib-cr, rmtF ve catB1 genlerini taşıdığı belirlendi. NDM geninin plazmit üzerinde taşındığı plazmit dizi analizi ile gösterildi. ISEcp1 üzerinde üç kopya OXA-181 ve bir kopya CTXM-15 bulunduğu gösterildi. MLST analizi sonucunda suşun ST14 sekans tipinde olduğu belirlendi.

Bu çalışma sonuçlarına göre, hastanemizde OXA-48 karbapenemaz enziminin en yaygın karbapenemaz tipi olduğu tespit edildi, NDM-1 tipi karbapenemaz enzimini taşıyan suş oranında artış olduğu gözlemlendi. OXA-48 ve NDM-1 tipi karbapenemazların plazmit üzerinde taşındığı transformasyon, tam genom ve plazmit genom dizi analizi çalışmaları ile gösterildi. Bu çalışmada tam genom dizi analizi ilk defa uygulanmış ve kolistin direncine de neden olan ve OXA-181 tipi karbapenemaz enziminin varlığı Türkiye'den ilk defa bildirilmiştir. Bu çalışma sonuçları uzun dönemde çok merkezli moleküler epidemiyoloji çalışmalarının yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Anahtar kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, OXA-48, NDM, karbapenemler, MLST, PFGE, PBRT

ABSTRACT

ERDEM F, Characterization of resistance genes and polymerase chain reaction based replicon typing in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*, Department of Clinical Microbiology, Istanbul Faculty of Medicine, Istanbul University, 2016

The clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* were obtained from 1500 inpatients in Istanbul Faculty of Medicine. Therefore, 50 isolates of *K. pneumoniae* isolated from various clinical samples between 2012 and 2016 that were found resistant against ertapenem, meropenem or imipenem using disc diffusion, were included in the study.

First, antibiotic sensitivity of strains were investigated in accordance with the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria using disc diffusion. Minimum inhibitor concentration (MIC) values of carbapenem group antibiotics were identified using the gradient test and a microdilution assay. The phenotype tests of double-disc synergy, boronic acid double-disc synergy, metallo-beta-lactamase E test, and the modified Hodge test (MHT) were performed to identify the carbapenemase activity. Class A (KPC, GES), Class B carbapenemases (IMP, VIM, NDM, SPM, SIM), OXA beta lactamase genes (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 and OXA-48) from Class D carbapenemases, CTX-M, TEM and SHV beta lactamases, and genes responsible for the reproduction of the acquired AmpC beta lactamase enzymes were investigated by performing polymerase chain reaction (PCR) experiments. Plasmid typing was performed using PCR-based replicon typing. The clonal relationship between the strains were investigated using pulse-field gel electrophoresis. In addition, complete genome sequence analysis and multilocus sequencing analysis were used on strains found resistant against colistin. The MIC values of carbapenemes were as follows: 2 - >32 mg/L for ertapenem, 0.5 - >32 mg/L for meropenem, 0.5 - >32 mg/L for imipenem, and 0.5 - >32 mg/L for doripenem. OXA-48-type carbapenemase-type genes were detected in 86% (n=43/50) of *K. pneumoniae* isolates, whereas NDM-type carbapenemase genes were detected in 14% (n=7/50) of the isolates. No other genes responsible for carbapenem resistance were detected. TEM in 62% (n=31), SHV in 78% (n=39), CTXM-1 in 50% (n=25), and CTXM-2-type beta-lactamase in 8% (n=4) of the strains were detected. CTXM -1 and SHV in 42% (n=21), TEM and SHV in 56% (n=28),

CTXM-1 and SHV in 38% (n=19), and TEM, SHV, CTXM-1 in 36% (n=18) and in 10%(n=5) CTXM-1 and CTXM-2 of the strains were found concomitant. No of 66, 69, 76, 77, 78 strains producing SHV, CTXM-1 and CTXM-2 concomitant in addition to OXA-48 or NDM-1 were described as hibrid strains. No plasmidic AmpC genes (FOX, CIT, MOX, DHA, ACC, EBC) were detected in multiplex PCR. Inc R-type replicon was detected in 50% (n=25) of 50 isolates with plasmid typing, whereas IncA/C-type replicon in 40% (n=20), and Inc FIIK-type replicon was detected in 18% (n=9) of the isolates. Ten strains could not be classified in any type. Outcomes of the transformation experiments revealed that OXA-48 gene was carried to the receiver cell on FII plasmids, and plasmid R did not transfer the OXA-48 gene. Ten different groups and 46 different genotypes were detected through the PFGE results of the isolates. No dominant clone or epidemia were detected. Two strains in group D and 2 strains in group F were found clonally-related. Strain number 1 was found 100% identical to *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 according to the outcomes of complete genome sequence analysis, and the strain carried the genes OXA-181, CTXM-15, NDM, arr-3, aac(6')-Ib-cr, rmtF and catB1. The outcomes of the study showed that NDM-type carbapenemase gene was carried on the plasmid. Three copies of OXA-181 and one copy of CTXM-15 were proven to be on *ISEcp1*. Outcomes of MLST analysis revealed that the strain was a ST14 sequence-type strain.

In conclusion, OXA-48 carbapenemase was detected as the most prevalent type of enzyme in our hospital, and presence of NDM–1-type carbapenemase carrying strain and an increase in their rate were detected. Transformation and complete genome analysis studies proved that OXA-48 and NDM–1-type carbapenemases were carried on plasmids. Complete genome sequence analysis was performed for the first time in our laboratory in this study. The present study is the first Turkish report of OXA–181-type carbapenemase causing colistin resistance. Our findings suggest that there is a need for long-term multi-centered molecular epidemiologic studies.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, OXA-48, NDM, karbapenemler, MLST, PFGE, PBRT

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Enterobacteriaceae ailesine ait türlerde antibiyotiklere direnç gelişmesi önemli bir problemdir. Dirençli bakterilerle gelişen infeksiyonların tedavisinde karbapenem grubu antibiyotikler son çare olarak kullanılmaktadır. Ancak karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzimlerini üreten enterik bakterilerin ortaya çıkması sorunun boyutunu daha da ağırlaştırmaktadır.

K. pneumoniae ülkemizdeki önemli nazokomiyal patojenlerden biridir. Enterik bakterilerde karbapenem direncinin hızla artması antibiyotik seçimini önemli ölçüde kısıtlamakta, mortalite ve morbiditenin artmasına, hastanede kalış süresinin uzamasına ve ekonomik kayıplara sebep olmaktadır. Karbapenem direncinin sıklıkla genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi ile birlikte olması antibiyotik seçimini oldukça zorlaştırmakta ve tedavi başarısızlıklarının artmasına yol açmaktadır.

Hastaneye yatış *K. pneumoniae* ile kolonizasyon için önemli bir risk faktörüdür. Kontrolsüz geniş spektrumlu antibiyotiklerin önü alınmaz bir şekilde kullanılması hastaların çoğul dirençli *K. pneumoniae* suşlarıyla infekte olmasına zemin hazırlamaktadır (1). Özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastalar ve bağışıklık sistemi baskılanmış olan hastalar, cerrahi alan hastaları, transplant hastaları için hayati tehlike oluşturan bu mikroorganizmanın transfer edilebilir direnç genlerine sahip olması, hastanede ve hatta ülkeler arasında dirençli suşların hızla yayılımına sebep olması nedeniyle geniş kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır. Karbapenamazlarla ilgili yeterli çalışmanın olmaması birçok ülkede prevelansının henüz bilinmemesinin sebebidir. Bunun yanında kontrolsüz antibiyotik kullanımı, hijyen kurallarına yeterince uyulmaması ve ülkeler ve şehirlerarası seyahat oranlarının gün geçtikçe artması karbapenemazların hızla yayılımında önemli risk faktörleridir.

Bu çalışmada 1500 yataklı İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi hastanesinde yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* klinik izolatlarında karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzim tiplerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, intrinsik plazmit replikaz genlerinin dağılımı ve bu plazmitlerin ülkemizde endemik olarak görülen OXA-48 karbapenemaz enzimi üretiminden sorumlu olan genlerle ilişkilerinin belirlenmesi, son dönemde ortaya çıkan

yeni karbapenemaz enzimlerinin varlığı ve sıklığı konusunda güncel durumun değerlendirilmesi ve suşların klonal ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*'nin Morfolojik Özellikleri ve Oluşturduğu Enfeksiyonlar

K. pneumoniae hareketsiz, sporsuz, kısa ve uçları yuvarlak, polisakkarit yapısında kapsüllü, aerop ve fakültatif anaerop özellik gösteren, 37 °C ve pH 7'de iyi üreyebilen Gram negatif çomak morfolojisinde bir bakteridir. Serolojik tiplendirmeler polisakkarit yapısı O (Somatik) ve K (Kapsül) antijenlerine göre yapılmaktadır. KpI, KpII-A, KpII-B ve KpIII şeklinde filogenetik olarak gruplandırılmıştır. *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ve *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* KP I grubu içinde subtipler olarak tanımlanmaktadır (1).

K. pneumoniae toplum kaynaklı ya da hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları, menenjit, pnömoni, sepsis, menenjit, yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojendir. Daha nadir olarak karaciğer absesi, invazif sendrom, septik artrit ve generalize püstülozis etkeni olarak da karşımıza çıkmaktadır (2, 3). *K. pneumoniae*'nin enfeksiyon etkeni olmasının yanı sıra ankilozan spondilit ya da Crohn hastalığını da tetiklediği rapor edilmiştir (4). *K. pneumoniae* Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.*) olarak tanımladığı, insan sağlığını en çok tehdit eden grubun önemli bir üyesidir (5).

Mortalite ve morbidite artışı, hastanede yatış süresinin uzaması ve tedavi masraflarının yükselmesine neden olan bu enfeksiyonun erken tanısı ve doğru tedavisi çok önemlidir. Karbapenemler tedavi seçenekleri arasında en son seçenek olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda özellikle GSBL oluşturan bakterilerin tedavisinde kullanımlarının artmasına bağlı olarak, artan oranda direnç gelişimi bildirilmektedir. Amerika Birleşik Devletlerinde her yıl yaklaşık 140.000 hastane ilişkili Enterobacteriaceae enfeksiyonları görülmekte ve bunların yaklaşık 1900 kadarını karbapeneme dirençli Enterobacteriaceae ailesine ait türler oluşturmaktadır. Hsueh (6) ve arkadaşları tarafından, 2007-2011 yılları arasında Kanada'da yapılan çok merkezli süveyans çalışmasında enfeksiyon etkenleri arasında *K. pneumoniae*'nin beşinci sırada yer aldığı bildirilmiştir (7).

2.2. *K. pneumoniae*'nin Epidemiyolojik Olarak Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Tiplendirme Yöntemleri

K. pneumoniae türünde bulunan suşları epidemiyolojik olarak tiplendirmek için çeşitli moleküler yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE bakteriyel tiplendirmede altın standart olarak kullanılan moleküler bir yöntemdir. Bu yöntemde bakteriyel DNA agarozda gömülür, Xba1 gibi restriksiyon endonükleazlarla rastgele kesilir, belli aralıklarla polariteyi değiştiren ve darbeleri akım kullanılan özel elektroforezle büyük DNA fragmentleri ayrılır. İşlem sonunda dendogramlar oluşturularak özgül paternler ayırt edilir (8).

2.2.2. Multi Lokus Sekans Tiplendirme Yöntemi (MLST)

MLST bakterinin korunmuş gen bölgelerinin tespitine dayanan hızlı, PFGE'ye göre daha az iş gücü gerektiren ve yüksek ayırım gücü olan moleküler bir tiplendirme yöntemidir. Korunmuş gen bölgelerinin dizi analizleri ile elde edilen dizilere allel numarası verilir. Allel numaraları MLST web sitesindeki veri tabanına girilerek sekans tipinin (ST) belirlenmesi esasına dayanır (9, 10). Bu yöntemin uzun vadeli epidemiyolojik çalışmalarda kullanılması önerilmektedir.

2.2.3. Ribotiplendirme

Bakteriyel ribotiplendirme yöntemi DNA fragmentlerinin 16S ya da 23S RNA'yı kodlayan ribozomal operonlar ile hibridizasyonuna dayanan Southern blot hibridizasyon yöntemidir (11).

2.2.4. Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD diğer adıyla Arbitrarily-primed PCR (AP-PCR) genomik DNA'nın düşük bağlanma sıcaklıklarında kısa primerlerle amplifiye edilmesi sonucunda DNA parmak izinin tespiti esasına dayanır (12).

2.2.5. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Teknik üç aşamada gerçekleştirilmektedir. İlk olarak DNA, restriksiyon enzimleri ile parçalanır ve oligonükleotid adaptörler bu parçalara bağlanır. Adaptör

spesifik primerler kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirilir. Son olarak jel elektroforezde ampikonlar ayrılır ve bant paternleri görüntülenir (10).

2.2.6. Repetitive Polimeraz Zincir Reaksiyonu (REP-PCR)

Bakteri genomunda bulunan tekrarlayan DNA elemanlarının PZR ile amplifikasyonuna dayanan PZR temelli moleküler tiplendirme yöntemidir. Repetitive extragenic palindromic (REP) ve enterobacterial repetitive intergenie consensus (ERIC) sıklıkla kullanılan tekrarlayan elemanlardır. REP-PCR sonuçları PFGE ile çoğunlukla uyumludur, fakat ayırım gücü PFGE'ye göre daha düşüktür (11).

2.2.7. Tam Genom Dizi (WHO) Analizi

Bu yöntemde de bakteri kromozomunun veya plazmitlerinin tam dizileri çıkarılmaktadır. Ancak diğer yöntemlere göre çok pahalı bir yöntemdir, rutin laboratuvarlarda kullanılması şimdilik önerilmemektedir. Çok pahalı cihazlara ve çok iyi yetişmiş teknik personele ihtiyacın olmasının yanı sıra, elde edilen dizilerin yorumlanması için de iyi bir biyoinformatik bilgiye ve programlara ihtiyaç vardır. Moleküler tiplendirme yöntemleri avantaj ve dezavantajları açısından tablo 1 de karşılaştırılmıştır.

Tablo 1: Moleküler tiplendirme yöntemlerinin karşılaştırılması

Yöntem	Avantaj	Dezavantaj	Gerekli Süre (gün)
PFGE	Tekrarlanabilirlik	İş gücü fazlalığı	3-5
MLST	Tekrarlanabilirlik	Yüksek maliyet	2-3
Ribotiplendirme	Otomatize	Pahalı, Standart yorumlama yok	2
RAPD	Ucuz, Hızlı	Düşük ayırım gücü	1
AFLP	Tekrarlanabilirlik	İş gücü fazlalığı	2
REP-PCR	Hızlı	Yöntem ve yorumlama standardize değil	1

2.3. *K. pneumoniae*'da Saptanan Plazmitler

Plazmitler, virulans faktörleri ya da antibiyotik direnci ile ilgili genleri taşıyan ve direnç genlerinin bakteriler arasında yayılımlarını sağlayan hücre DNA'sından bağımsız olarak replike olabilen ekstra kromozomal çift sarmallı DNA molekülleridir (13). Direnç genlerinin aktarılması konjugasyon yoluyla horizontal olarak, ayrıca ebeveyninden yeni bakterilere vertikal olarak gerçekleştirilir. Direncin yayılımı plazmitlerin sahip olduğu insersiyon sekanslar ve transpozonlar yoluyla olmaktadır. Bakteriler arasında direncin yayılımında plazmitlerin rolü ilk kez 1961 yılında Watanaba ve arkadaşları tarafından ortaya çıkarılmıştır. Watanaba ve arkadaşları duyarlı ve dirençli suşlar aynı intestinal sistemde bulunduğunda, direncin plazmitler aracılığıyla duyarlı suşlara aktarıldığını göstermişlerdir (14).

K. pneumoniae suşları genellikle birden fazla plazmit taşımaktadır ve günümüzde 70'den fazla *Klebsiella* suşunda tam plazmit analizi yapılmıştır. *Klebsiella*'da bulunan plazmitlerin büyük bir kısmı 2-2,5 kbp aralığında konjugatif olmayan ve çoğu zaman direnç gelişiminde rol oynamayan küçük plazmitlerdir (ColE1 tip plazmitler). *K. pneumoniae*'da bulunan büyük plazmitler ise çoğunlukla antibiyotik direnç genlerini ya da virulanstan sorumlu genleri taşımaktadırlar (15). pKPN2 (4,196 bp) pIP843(7,086 bp), pJHCMW1 (11,354bp), P15S (8,197 bp), PColEST258 (13,636 bp), pKleB-k17/80 (5,258 bp), Ph205 (8,197 bp) tam dizi analizi yapılan *K. pneumoniae* ColE1 plazmitleridir (15-20). FIIK *Klebsiella* cinsinde en fazla sıklıkta bulunan replikondur ve birçok çalışmada CTXM-15 genini taşıdığı gösterilmiştir (21).

2.3.1. Plazmitlerin Sınıflandırılması

Plazmitler büyüklüklerine, inkompabilite gruplarına, konjugatif özelliklerine ve taşıdıkları spesifik özelliklere göre sınıflandırılmaktadır. Büyüklüklerine göre plazmitler; 50 bp üzerindeki plazmitler büyük plazmit olarak kabul edilir. Konjugatif özelliklerine göre plazmitler; konjugasyon bakteriler arasında genetik materyal değişimine ve dolayısı ile de bakteri evrimine olanak tanıyan önemli bir mekanizmadır. Bakteriler arasında konjugasyonla genetik özellik aktarımında, konjugasyon özelliği olan plazmitlerdeki oriT, relaksaz protein, tip 4 sekresyon proteinler (T4CP protein) rol oynamaktadır. Ori T bölgesi ve relaksaz proteinin nükleoprotein kompleksini oluşturması Tip 4 sekresyon sisteminin çalışmasını ve genetik bilginin aktarımını sağlamaktadır. Konjugasyon için gerekli tüm elemanlara sahip ikinci bir konjugatif plazmit gerektirmeyen plazmitler kendi kendine aktarılabilen (self transmissible) diğer adıyla konjugatif plazmit olarak adlandırılırken, konjugasyon için ikinci bir plazmite ihtiyaç varsa non-transmissible veya mobilize plazmit olarak adlandırılırlar (22).

İncompabilite gruplarına göre plazmitler; Plazmitler 1971'de Hedges ve Datta tarafından compabilite özelliklerine göre sınıflandırılmıştır. Aynı replikasyon kontrol noktasına sahip plazmitler incompatible, farklı replikasyon kontrol noktasına sahip plazmitler compatible kabul edilir. Aynı Inc grubundan iki plazmit aynı hücre içinde varlıklarını devam ettiremezler (23, 24). Enterobacteriaceae'da 27, Pseudomonas cinsi bakterilerde 14 ve stafilokoklarda 18 incompabilite grup tanımlanmıştır (25). Enterobacteriaceae ailesinde en sık bulunan ve antibiyotik direncinin yayılımında rol oynayan replikon tipi IncF dir (13).

2.3.2. Plazmitlerin Tanısı ve Tiplendirilmesinde Kullanılan Yöntemler

2.3.2.1. Plazmitlerin dizi analiziyle tanımlanması

Karşılaştırmalı tam plazmit dizi analizi, plazmitlerin genetik çeşitliliğini, evrimsel tarihini göstermesinin yanı sıra, plazmitler üzerinde taşınan genler için önemli bir veri tabanı oluşturmuştur. Günümüzde 24.07.2016 tarihi itibarıyla genbankta kayıtlı 152258 plazmit dizisi vardır (26). Enterik bakterilerde bulunan dizi analizi yapılmış, karbapenemaz genlerini taşıyan plazmitler tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2: Karbapenemaz genlerini taşıyan ve tam genom dizi analizi yapılmış enterik bakteriler de bulunan plazmitler (13)

Plazmit	Cins	Kaynak	Ülke	Direnç geni	Plazmit ailesi
pSLMT	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	İngiltere	<i>blaKPC-2</i>	IncF
pKP048	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Çin	<i>blaKPC-2</i>	IncF-IncR
pKPHS2	<i>K. pneumoniae</i>	-	Çin	<i>blaKPC-2</i>	IncF-IncR
plazmit 9	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	ABD	<i>blaKPC-2</i>	IncN
pKPC-NY79	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Çin	<i>blaKPC-2</i>	IncX3
plasmid 15S	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	ABD	<i>blaKPC-2</i>	RCR
pKpQIL-IT	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	İtalya	<i>blaKPC-2</i>	IncF
pKpQIL	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	İsrail	<i>blaKPC-3</i>	IncF
plasmid 12	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	ABD	<i>blaKPC-3</i>	IncN
pRYCKPC3.1	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	İspanya	<i>blaKPC-3</i>	RCR
pNE1280	<i>E. cloacae</i>	İnsan	ABD	<i>blaKPC-4</i>	IncL/M
pNDM-1 Dok01	<i>Escherichia coli</i>	İnsan	Japonya	<i>blaNDM-1</i>	IncA/C
pNDM102337	<i>Escherichia coli</i>	İnsan	Kanada	<i>blaNDM-1</i>	IncA/C
pNDM10505	<i>Escherichia coli</i>	İnsan	Kanada	<i>blaNDM-1</i>	IncA/C
pNDM10469	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Kanada	<i>blaNDM-1</i>	IncA/C
pNDM-KN	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Kenya	<i>blaNDM-1</i>	IncA/C
pNDM-CIT	<i>C. freundii</i>	İnsan	Hindistan	<i>blaNDM-1</i>	IncHI1
pNDM-HK	<i>Escherichia coli</i>	İnsan	HongKong	<i>blaNDM-1</i>	IncL/M
p271A	<i>Escherichia coli</i>	İnsan	Avusturalya	<i>blaNDM-1</i>	IncN2
pTR3	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Tayvan	<i>blaNDM-1</i>	IncN2
pNDM-HN380	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Çin	<i>blaNDM-1</i>	IncX3
pNDM-MAR	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Morokko	<i>blaNDM-1, blaCTX-M-15, qnrB1</i>	IncHI3
pMR0211	<i>Providencia stuartii</i>	İnsan	Afganistan	<i>blaNDM-1, qnrA1</i>	IncA/C
pTOXA181	<i>C. freundii</i>	İnsan	Hindistan	<i>blaOXA-181</i>	IncT
pNL194	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Yunanistan	<i>blaVIM-1</i>	IncN
pKOX105	<i>Klebsiella oxytoca</i>	İnsan	İtalya	<i>blaVIM-1, qnrS1</i>	IncN
pTC2	<i>Providencia stuartii</i>	İnsan	Firansa	<i>blaVIM-1</i>	IncA/C, IncR
pEI1573	<i>E. cloacae</i>	İnsan	Avusturalya	<i>blaIMP-4, qnrB2</i>	IncL/M
pKPI-6	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Japonya	<i>blaIMP-, blaCTXM-2</i>	IncN
pEC-IMP	<i>E. cloacae</i>	İnsan	Tayvan	<i>blaIMP-8</i>	IncHI2
pEC-IMPQ	<i>E. cloacae</i>	İnsan	Tayvan	<i>blaIMP-8, qnrB2</i>	IncHI2
pKP3-A	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Umman	<i>blaOXA-181</i>	RCR
pOXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	İnsan	Türkiye	<i>blaOXA-48</i>	IncL/M

2.3.2.2. Plazmit Multilokus Sekans Tiplendirme Yöntemi (pMLST)

Antibiyotik direncinin yayılımında sıklıkla rol alan I1, HI1, HI2, F ve N ailesinden plazmitlerin benzerliklerinin değerlendirilmesinde ve epidemiyolojik verilerin oluşturulmasında dizileme temelli tiplendirme yöntemleri geliştirilmiştir. Plazmit multilokus sekans tiplendirme yöntemi (pMLST) farklı kaynaklardan ve ülkelerden benzer plazmitlerin karşılaştırılmasını sağlamak ve antibiyotik direnci epidemiyolojisinin araştırılmasını desteklemektedir (27).

2.3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Temelli Plazmit Replikon Tiplendirmesi (PBRT)

PBRT replikonların hedef alındığı polimeraz zincir reaksiyonu temelli plazmit tiplendirme yöntemidir. Caratolli ve arkadaşları tarafından geliştirilmiş olan PBRT kiti (Diatheva, İtalya) ile Enterobacteriaceae türleri arasında aktarılan 25 ayrı replikonun varlığı 8 multipleks PZR deneyi ile araştırılmaktadır. Kit *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık karşılaşılan plazmit ailelerinin replikonlarını (HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, L/M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIC, W, Y, P, A/C, T, K, U, R, B/O, HIB-M, FIB-M) tespit etmeye yönelik geliştirilmiştir (28-30). *Enterobacteriaceae* ailesinde tanımlanmış olan replikonlar ve kaynakları Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Polimeraz zincir reaksiyonu temelli plazmit replikon tiplendirmesinde kullanılan replikonlar (28, 30, 31).

Replikon	Referans plazmit	Inc grup
HI1	<i>Salmonella typhi</i> R27 <i>Citrobacter freundii</i> pNDM-CIT	IncHI1
HI2	<i>Serratia mercescens</i> R478	IncHI2
A/C	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA 1	IncA/C
I1	<i>S.enterica</i> Typhimurium R64	IncI1
I2	<i>Escherichia coli</i> R721	IncI2
L/M	<i>Citrobacter freundii</i> Pctx-M3	IncL/M
N	<i>Escherichia coli</i> R46	IncN
K	<i>Escherichia coli</i> R387	IncK
B/O	<i>Esherichia</i> p3521	IncB/O
W	<i>Escherichia coli</i> R721	IncW
P	Inc—alphaplasmid	IncP
T	<i>Proteus vulgaris</i> Rts1	IncT
U	<i>Aeromonas hydrophila</i> RA3	Inc U
R	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Pk245	IncR
Y	<i>Enterobacteria</i> phage P7	IncY
X1	<i>Esherichia coli</i> pOLA52	IncX1
X2	<i>Esherichia coli</i> R6K	IncX2
HIB-M	pNDM-MAR	IncH-new
FIB-M	pNDMMAR	IncFib-new
FI-A	Plasmit F	Inc F
FI-C	Plasmit F	Inc F
FII	<i>Esherichia coli</i> NR1	Inc F
FIIS	<i>S.enterica</i> Typhimurium pLST	Inc F Salmonella
FIik	<i>Klebsiella pnemoniae</i> KPN3	Inc F Klebsiella

2.4. *K. pneumoniae*'da Antimikrobiyallere Direnç

Hızla artan antimikrobiale direnç ve yeni antibiyotik keşfindeki yetersizlikler bakteriyel infeksiyonlar için tedavi seçeneklerini kısıtlamıştır (31). Hastaneye yatış, kalıcı katater, vantilatör ilişkili pnömoni, transplantasyon, diyabet, solit tümör varlığı, geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı ve karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KPE) suşları ile kolonizasyon, KPE için risk faktörleri olarak sıralanabilir (32-34) .

2.4.1. Beta laktam Grubu Antibiyotiklere Direnç

Bakteriler oluşturdıkları beta laktamaz enzimleri ile beta laktam halkasındaki amid bağı parçalayarak beta laktam grubu antibiyotiklere enzimatik olarak direnç

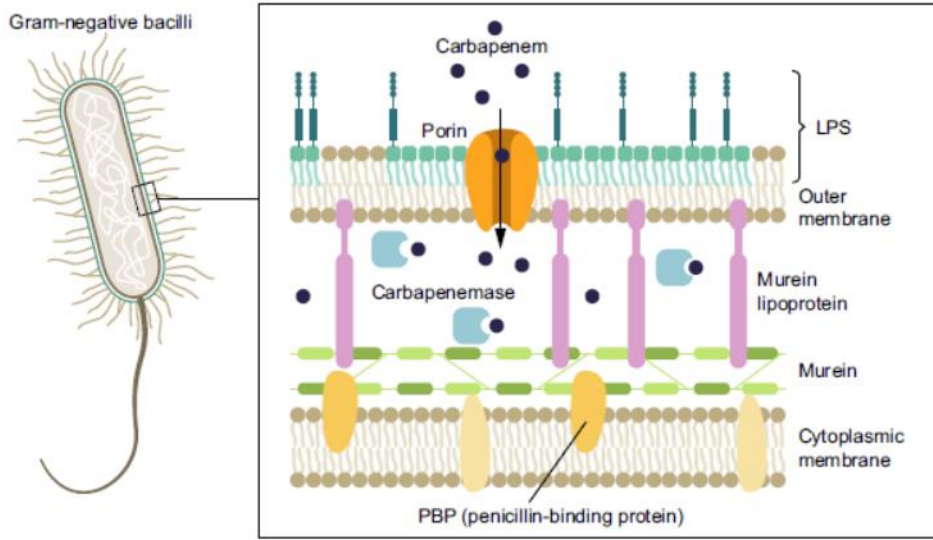
geliştirirler. Beta laktamazlar Ambler tarafından moleküler yapılarına göre A, B, C ve D olarak dört sınıfta gruplandırılmıştır (35).

Tablo 4: Ambler beta-laktamaz sınıflandırması

Sınıf	Aktif Bölge	Enzim	Substrat
A	Serin	Penisilinazlar ✓ Dar spektrumlu beta laktamazlar ✓ Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar Karbapenemazlar	✓ Benzilpenisilin, aminopenisilin, karboksipenisilin, üredopenisilin, dar spektrumlu sefalosporinler ✓ Dar spektrumlulara ilave olarak oksiaminobetalaktamlar(seftriakson, sefotaksim, seftazidim) Genişlemiş spektrumlu beta laktamlara ilave olarak sefamisin ve karbapenemler
B	Metallo-beta laktamaz (Çinko)	Karbapenemazlar	Genişlemiş spektrumlu beta laktamlara ilave olarak sefamisin ve karbapenemler
C	Serin	Sefalosporinazlar	Genişlemiş spektrumlu betalaktamlara ilave olarak sefamisinler
D	Serin	Oksasilinazlar ✓ Dar spektrumlu ✓ Genişlemiş spektrumlu Karbapenemazlar	✓ Aminopenisilin, üredopenisin, kloksasilin, metisilin, oksasilin ✓ Dar spektrumlulara ilave olarak oxiaaminobetakatamlar ve monobaktamlar Genişlemiş spektrumlu beta laktamlara ilave olarak sefamisin ve karbapenemler

2.4.2. Karbapenem Grubu Antibiyotiklere Direnç

Karbapenemler Gram pozitif, Gram negatif ve anaerop bakterilere etkinliği olan oldukça geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İmipenem, meropenem, ertapenem, doripenem ve faropenem karbapenem grubu antibiyotik grubunun başlıca üyeleridir. Karbapenemler yüksek molekül ağırlıklı penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Karbapenemlerin hücre duvarına olan etkileri Şekil 1’de gösterilmiştir.



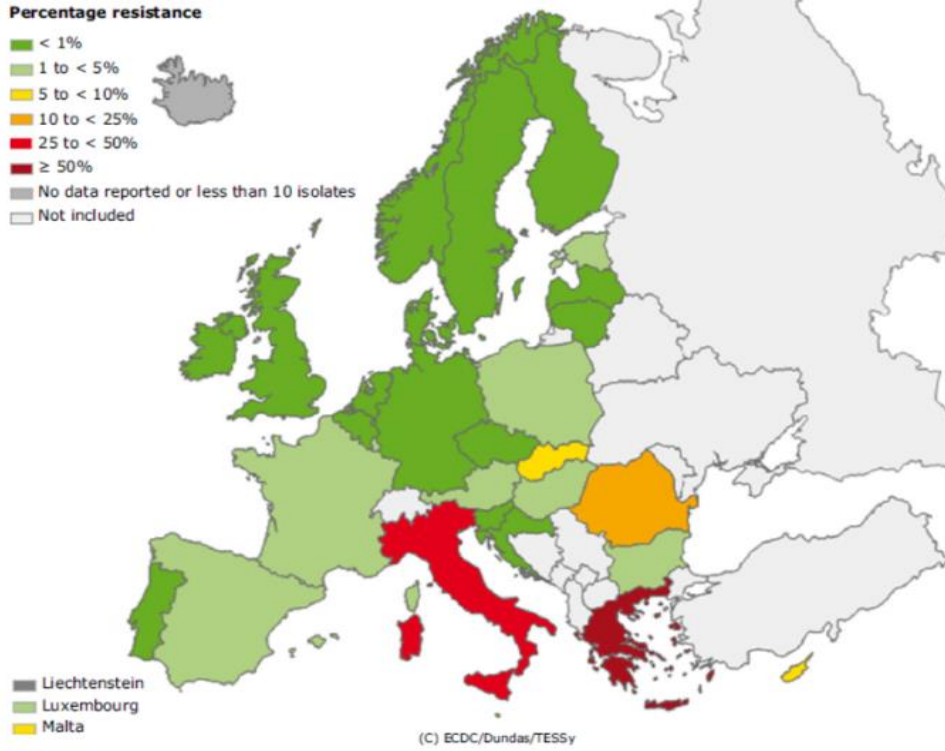
Şekil 1: Karbapenem direncinden sorumlu mekanizmaların şematik gösterimi

Karbapenemler gastrointestinal sistemden emilimleri çok az olduğundan parantral olarak kullanılmaktadırlar. İmipenem ve meropenemin plazma yarı ömürleri bir saat iken, proteinlere yüksek bağlanma afinitesi olan ertapenemin plazma yarı ömrü 4 saattir ve bu durum ertapenem için günde tek doz olarak kullanım avantajı sunar. *C. difficile* koliti, koagülasyon bozuklukları, nefrotoksisite veya hepatotoksisite karbapenemlerin önemli yan etkileri olarak görülebilir. Hastaların %1-3'ünde bulantı, kusma, baş ağrısı, flebit gibi yan etkiler görülebilir. GABA ile ortak reseptörleri içermesinden dolayı az da olsa inme yan etki olarak rapor edilmiştir. Bu yan etki özellikle böbrek yetmezliği, beyin lezyonu veya epilepsisi olan hastalarda yüksek doz imipenem kullanımı sonucu görülebilmektedir (36).

Karbapenem direnci başlıca üç mekanizmayla olmaktadır; (I) karbapenem grubu antibiyotikleri parçalayan beta laktamazların üretimi, (II) dış membran proteinlerinin azalması veya kaybına bağlı azalmış geçirgenlik ve (III) ilacın eflux pompalarıyla dış membrandan atılımı. Karbapenem direnç mekanizmaları şekil 1'de şematize edilmiştir. Omp K35 ve OmpK36 proteinlerinin azalmasıyla birlikte GSBL üretimi veya AmpC beta laktamazların aşırı üretimi ertapenem direncinden sorumlu tutulmuştur (37).

2.5. Karbapenemaz Enzimlerinin Sınıflandırılması, Epidemiyoloji, Moleküler özellikleri, Tedavi Seçenekleri ve Tanı Yöntemleri

Karbapenemazlar, enzimin aktif bölgesinde bulundurdıkları divalen katyonlara bağlı olarak metallo beta laktamazlar (sınıf B- aktif bölge çinko) ve non-metallo beta laktamazlar (A,C ve D) olarak iki grupta sınıflandırılmaktadırlar (33).



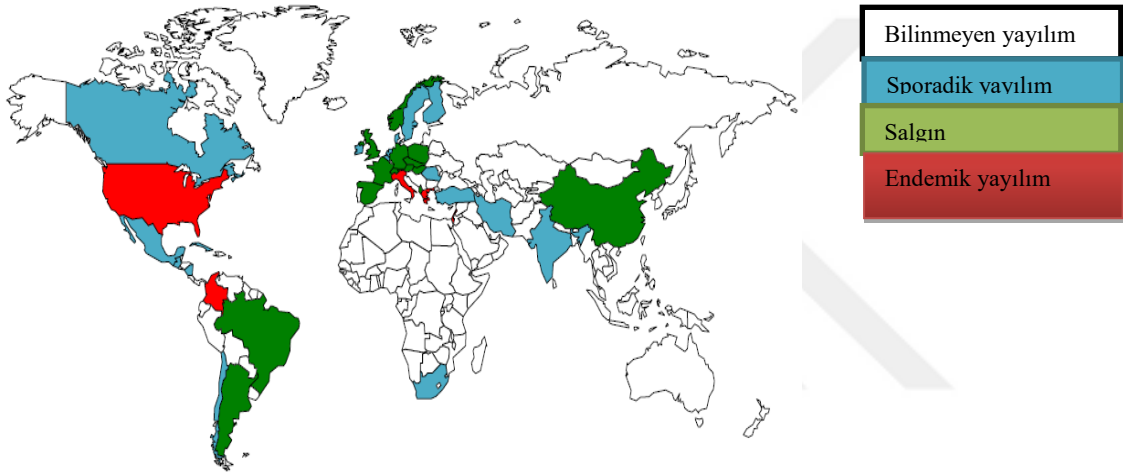
Şekil 2: Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının Avrupa ülkelerindeki sıklık dağılımı ECDC verileri (38).

2.5.1. Sınıf A Karbapenemazların Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri

Sınıf A karbapenemazlar, kromozom tarafından kodlananlar (IMI-1, NMC-A, SME, SHV-38, SFC-1) veya plazmit tarafından kodlananlar (KPC, GES, IMI-2) olarak iki grup altında toplanırlar.

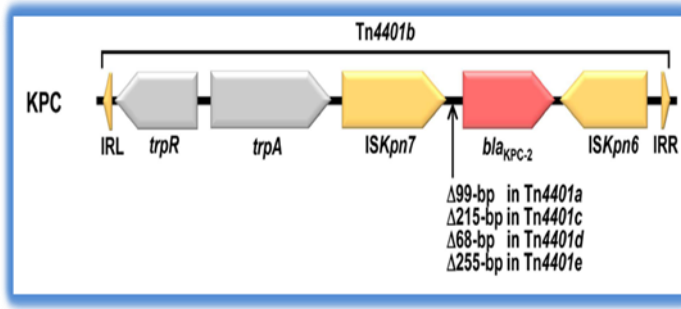
K. pneumoniae'da ilk kez 1996 yılında ABD'den rapor edilen *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enzimi bu grubun en sıklıkla görülen üyesidir (38). Sefamisinler dışındaki tüm beta laktamları hidrolize etmektedir. Avrupa'da KPC enzimi ilk defa

2003 yılında İskoçya'dan bir Enterobakter türünde bildirilmiştir (39), *K. pneumoniae*'da ise 2007 yılında İskoçya'dan bildirilmiştir (40). KPC üreten *K. pneumoniae* suşlarının Amerika Birleşik Devletleri, Çin, İtalya, Polonya, İsrail, Brezilya, Tayvan 'da endemik yayılımı rapor edilmiştir (41). İngiltere, Almanya, İsveç, İrlanda sporadik yayılımın olduğu Avrupa ülkeleridir (42). ABD'de sıklıkla rastlanan ST258 klonu sporadik yayılımın kaynağını oluştururken, Çin ve Tayvan gibi uzak doğu ülkelerinde ST11 sporadik yayılımdan sorumlu tutulmuştur (43).



Şekil 3: KPC tipi karbapenemazların coğrafik dağılımı.

KPC'nin aktarımından sıklıkla sorumlu olan plazmitler IncF ve IncFIIK olarak bilinmektedir (44). Genellikle plazmit üzerinde lokalize hareketli genetik elementler olan transpozonlar KPC-2 yayılımında önemli rol oynamaktadırlar. Major klonlar olan ST258 yayılımından *Tn4401* transpozonu sorumlu tutulurken, ST11 yayılımından *Tn80I-like* transpozonu sorumlu tutulmaktadır (45). Şekil 4; (46) Transpozonlar dışında *ISKpn6* hareketli elemanları da KPC yayılımında rol oynamaktadır.



Şekil 4: Tn4401b Naas et al. (46).

KPC üreten *K. pneumoniae* suşları çoğunlukla tüm beta laktam antibiyotiklere, kinolonlara, aminoglikozitlere, tigesiklin, fosfomisin ve kolistine de dirençlidir. Bakterisidal etkiyi sağlamak ve yeni direnç gelişimini önlemek için kombinasyon tedavisi önerilmektedir. Kolistin dirençli KPC pozitif *K. pneumoniae* suşlarında tigesiklin, kolistin ve meropenemli kombinasyonlar etkili bulunmuştur (47).

Kolistin Gram negatif bakterilere etkisini dış membranındaki anyonik yapıdaki LPS'ye etki ederek, bakteri hücre zarı üzerinde harabiyete neden olarak göstermektedir. Kombinasyon tedavisi içinde ve tek başına olarak tedavi seçeneği sunan kolistine son yıllarda artan oranda direnç bildirilmektedir. MgrB geninin inaktivasyonu ve PmrA/PmrB ve PhoP/PhoQ iki komponentli regulatuar sistemlerdeki gen modifikasyonları *Klebsiella pneumoniae*'da kolistin direncinin bilinen en yaygın nedenleridir. PmrE ve PmrHFIJKLM gen ekspresyonunu sağlar LPS'in fosfat gruplarına etanolamin, lipid A'ya 4-amino-4-deoxy-L-arabinose ekleyerek katyonik polimiksinlerin bağlanma affinitesini azaltır (48). Ayrıca plazmit üzerinde lokalize fosfoetanolamin transferazı kodlayan *mcr-1* geni de kolistin direncinin horizontal yayılımından sorumlu tutulmuştur (49).

Fosfomisin N-asetilglukozamin-3-enolpuriltransferaz enzimini inaktive ederek bakteri hücre duvarı sentezini inhibe eden geniş spektrumlu antibiyotiktir. Fakat son yıllarda artan oranda fosfomisin direnci de bildirilmiştir (50).

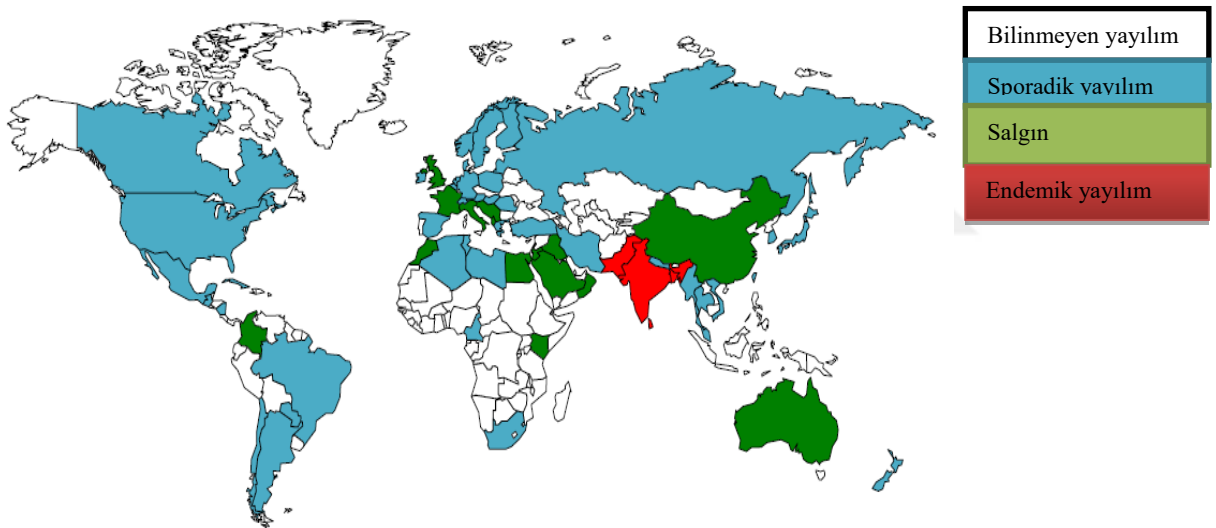
2.5.2. Sınıf B Karbapenemazların (Metallo beta laktamazlar) Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri

Metallo beta laktamazlar monobaktamlar hariç tüm beta laktam antibiyotikleri hidrolize etme yeteneğindedirler. *Enterobacteriaceae* ailesinde sıklıkla rapor edilen

üyeleri IMP ve VIM enzimleri iken, günümüzde NDM enzimi artan oranda bildirilmektedir (51).

IMP-1 grubun ilk tanımlanan üyesidir ve 1991 yılında Japonya'dan *S. marcescens* suşunda bildirilmiştir (52). Sonrasında birçok Avrupa ülkesi ve ABD'den bildirimler olmuştur. *K. pneumoniae*'da Türkiye'den ilk bildirim ise 2006 yılında olmuştur (53).

NDM metallo beta laktamaz ilk olarak 2008 yılında New Delhi'de tanımlanmıştır. (54). NDM üreten *K. pneumoniae* suşları Amerika birleşik devletleri, Türkiye (51), Kanada (55), İspanya (56), Fransa, İtalya, Yunanistan (57), İsviçre başta olmak üzere birçok Dünya ülkesinde sporadik olarak bildirilmiştir (58). NDM Hindistan, Singapur ve Birleşik Arap Emirlikleri'nde en sık görülen karbapenemaz tipidir (59-61).



Şekil 5: NDM Tipi Karbapenemazların Coğrafik Dağılımı (42).

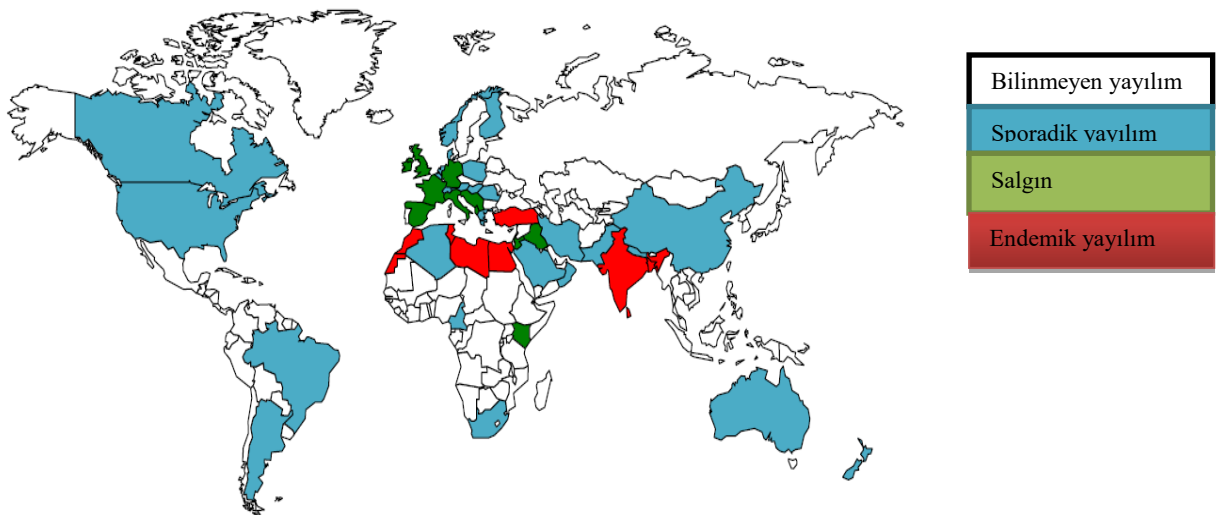
NDM tipi karbapenemazlar çoğunlukla plazmitler üzerinde lokalizedirler ve NDM tipi karbapenemazın horizontal yayılımından sorumludur. NDM tipi karbapenemazın IncA/C, IncL/M, IncN, IncF, IncH ve IncHI1 plazmit inkompatibilite gruplarında bulunduğu rapor edilmiştir. İlk defa *Acinetobacter* türlerinde Tn125 transpozonları üzerinde gösterildiğinden NDM tipi karbapenemazları *Enterobacteriaceae* ailesine geçişinin *Acinetobacter* türlerinden olduğu düşünülmektedir (62). ST11, ST14, ST147, ST340, ST149 ve ST231 NDM ile

ilişkilendirilmiş *K. pneumoniae*'da bildirilen sekans tipleridir. ST11 NDM, KPC ve OXA-48 ile de ilişkilendirilen yüksek riskli sekans tipidir (63).

NDM pozitif *K. pneumoniae* izolatları genellikle birçok beta laktam antibiyotiğe dirençli bulunurken, aztroenama duyarlı bulunmaktadır (64). Rifampin/ meropenem/ kolistin, kolistin/ fosfomisin, aztroenam/ avibaktam kombinasyonları NDM pozitif izolatlarda etkili bulunmuştur (65-67).

2.5.3. Sınıf D Karbapenemazların (Oksasilinazlar) Epidemiyolojisi, Moleküler Özellikleri ve Tedavi Seçenekleri

Sınıf D beta laktamazlar izoksasil penisilinleri (oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin) benzilpenisilinlere göre daha hızlı hidrolize etme yeteneğine sahiptirler. Bir kısmı karbapenemaz aktivitesine sahiptir ve günümüzde birçok OXA karbapenemaz enzimi tanımlanmıştır; OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229, OXA-235. OXA-23, OXA-48, OXA-51, OXA-58 ve OXA-181 *Klebsiella* suşlarında bildirilmiştir (68-72). Sınıfın en sık görülen üyesi olan OXA-48 ilk kez 2003 yılında Türkiye'den bildirmiştir (73). Türkiye, Morocco, Libya, Mısır, Tunus OXA-48 enziminin endemik olarak görüldüğü ülkelerdir (42).



Şekil 6: OXA-48 tip karbapenemazların coğrafik dağılımı (42).

Sınıfın yeni bir üyesi olan Oxa-181 tipi sınıf D karbapenemaz OXA-48 enziminin yapısına bir aminoasit eklenmesiyle oluşan türevidir ve ilk defa 2011 yılında Potron ve arkadaşları tarafından Hindistan'dan bildirilmiştir (70). Ardından hızla diğer Dünya ülkelerinden de bildirimler olmuştur. OXA 181, yapılan tam genom analizi çalışmalarında kolistin direnci ile de ilişkilendirilmiştir. OXA-181 taşıyan *K. pneumoniae* suşlarında tam genom dizi analizi çalışmalarının artırılması OXA-181 enziminin kolistin direnci ile ilişkisini açığa kavuşturacaktır (74). Diğer türevler olan OXA-204 ve OXA-232 yine Hindistan'dan, OXA 163 Tunus, Fransa ve Arjantin'den ve OXA 244 ve OXA 245 ise ilk defa İspanya'dan bildirmiştir (75-77).

OXA-48 çoğunlukla GSBL üretimi ile birlikte bulunmaktadır ve izolatlar karbapenemler yanında çoğunlukla birçok beta laktam antibiyotiğe de dirençlidirler. GSBL ile birlikte olmadıklarında geniş spektrumlu sefalosporinlere duyarlı bulunabilirler. Yapılan sinerji çalışmalarında fosfomisinli kombinasyonlarla OXA-48 pozitif izolatlarda değişen oranlarda sinerji saptanmıştır (78).

2.5.4. Sınıf C Karbapenemazlar

Sınıf C karbapenemazlar penisilinlere, sefalosporinlere ve sefamisinlere direnç gelişimine neden olurlar ve beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar. ACT-1, CMY-2, CMY-10, ve ADC-68 bildirilen sınıf C karbapenemazlardır. ACT-1 ve CMY-2 karbapenemlere azalmış duyarlılıktan sorumludur (79).

2.6. Karbapenemazların Tanımlamasında Kullanılan Güncel Tanı Yöntemleri

Karbapenem dirençli bakterilerle olan enfeksiyondan ölüm oranlarını azaltmak ve karbapenemazların yayılımını önlemek için bu enfeksiyonların erken teşhis ve tedavisi çok önemlidir. Karbapenemaz üreten suşların erken teşhisi enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması, kolonize hastaların teşhisi ve dekolonizasyonu, taşıyıcı hastaların erken teşhis ve izolasyonu için kritik öneme sahiptir (71). Xpert R Carba-R Test multipleks PCR temeline dayanan KPC, NDM, IMP ve VIM için %100 duyarlılık ve %77 özgüllüğe sahip moleküler bir testtir (80). Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI TOF MS) ve ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) gibi mass spektrofotometrik temelli yöntemler karbapenemlerin teşhisinde rutin olarak kullanılabilecek yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip hızlı tanı yöntemleridir (81).

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) metodu gen amplifikasyonuna dayanan hızlı bir yöntemdir. Yöntemde hedef DNA'daki spesifik sekans bölgelerine yönelik dört takım primer ve DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. DNA amplifikasyonu izotermal sıcaklıklarda (63-65 °C) gerçekleştirilmektedir. Yüksek özgüllük ve etkinliğe sahip, hızlı bir yöntemdir (82).

Karbapenemazların tanımlanması zor ve zaman alıcıdır. Kullanılan moleküler yöntemler deneyimli personel ve ekipman gerektirmektedir. Bu nedenle karbapenemaz teşhisi için hızlı, basit ve ulaşılabilir fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Modifiye Hodge Test (MHT), blue karba test, Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS), Karba NP Test, kombinasyon disk testleri (boronik asit ve EDTA veya dipiklonik asit ile) karbapenemaz teşhisinde kullanılan hızlı tanı yöntemleridir. Karba NP test kromojenik medyada, enzimin karbapenem beta laktam halkasını parçalaması ile gerçekleşen asidifikasyon sonucu indikatör olarak kullanılan fenol kırmızısındaki renk değişiminin tespitine dayanır. KPC, IMP, VIM, NDM ve OXA-48 enzimlerinin belirlenmesinde %97.9 duyarlılık, %100 özgüllüğe sahiptir (83). Blue karba test ise imipenem hidrolizi ile pH'da olan değişimin indikatör yardımı ile gözlemlenmesine dayanan, direk koloniden çalışılabilen, ekstraksiyon gerektirmeyen hızlı tanı yöntemidir (84).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2014 yılında 2379 numaralı proje olarak desteklenmiştir. Çalışma İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Istituto Superiore Di Sanita Paraziter ve Immunitè İlişkili Hastalıklar Departmanı Laboratuvarlarında yapılmıştır. 2012-2016 yılları arasında İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesin’de yatmakta olan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen karbapenemlerden herhangi birine disk difüzyon yöntemi ile dirençli ya da orta duyarlı bulunan *K.pneumoniae* izolatları çalışmaya dahil edilmiştir. Triptik soy broth agar besiyerine pasaj alınan izolatlar bir gece inkübasyondan sonra çalışma sırasında kullanılmak üzere -80°C’de muhafaza edilmiştir.

3.1. Bakterilerin Tanımlanması ve Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri

3.1.1. Bakteri tanımlaması

İzolatlar konvansiyonel ve otomatize sistemlerle identifiye edildi (VITEC 2, bioMérieux France). Antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle yapıldı. Ampisilin, sefazolin, sefoksitin, seftriakson, sefotaksim, sefepim, seftazidim, aztroenam, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, ertapenem, meropenem, trimetoprim/sulfametaksazol, amikasin, tobramisin ve siprofloksasin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile tarandı. McFarland 0.5’e göre ayarlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton agar (Oxoid) besiyerine inoküle edildi. Ampisilin (30 µg), sefazolin (30 µg) , sefoksitin (30 µg) ve sefuroksim (30 µg); üçüncü kuşak sefalosporinler olan sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), seftriakson (30 µg); dördüncü kuşak sefalosporin olan sefepim (30 µg), monobaktam bir antibiyotik olan aztreonam (30 µg) tigesiklin(15 µg), kolistin(10 µg) ve GSBL varlığını tespit etmek için merkezden merkeze 25 mm uzağa olacak şekilde sefotaksim ve amoksisilin klavulonik asit (AMC) (20/10 µg) deiskleri yerleştirildi (Oxoid). 37°C’de 18-24 saat aerop koşullarda inkübasyondan sonra sefotaksim ve AMC diski arasındaki inhibisyon zonunda

genişleme olması sinerjinin göstergesi olarak yorumlandı. İmipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem MİK değerleri Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerilerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Antibiyotik duyarlılık testlerinde kalite kontrol suşları olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Escherichia coli* ATCC 35218 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 suşları kullanıldı (85).

3.2. Fenotipik Yöntemler

Karbapenemazlar MHT (meropenem ve ertapenem diskleri kullanılarak), boronik asit çift disk sinerji testi ve MBL-E testi ile fenotipik olarak araştırıldı.

3.2.1. Modifiye Hodge Testi (MHT)

MHT için 0,5 McFarland standardına uygun hazırlanan *E. coli* ATCC 25922 süspansiyonları 1/10 oranında Mueller Hinton buyyonda dilüe edilerek, Mueller-Hinton (MHA) agar plağına eküvyon ile ekildi. Plakların kuruması için 3–10 dakika bekletildikten sonra ertapenem, meropenem diskleri her biri ayrı plak merkezine yerleştirildi. 10µl'lik bir öze veya eküvyon ile 18-24 saatlik kültürlerden üretilmiş olan test bakterisinden alınarak diskin kenarından dışarı doğru 20–25 mm uzunluğunda düz bir çizgi şeklinde ekildi. Plaklar etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirildi. MHA plağına test bakterisinin çizgisi ile inhibisyon zonunun kesişme noktasındaki üreme artışına değerlendirildi. Üreme artışının olması pozitif sonuç olarak kabul edildi (86). Pozitif kontrol olarak KP11978 suşu kullanıldı (73).

3.2.2. Boronik Asit Çift Disk Sinerji Testi

Taze kültürlerden elde edilen her bir izolat 0,5 Mc Farland standardize edilmiş süspansiyondan steril eküvyon yardımıyla iki adet Mueller Hinton agar plağına yayıldı. Fenil boronik asidin (benzen boronik asit) dimetil sulfoksit içinde 20 mg/ml konsantrasyonda olacak şekilde çözünmesi sağlandı. Bu solüsyon da imipenem (10 µg) ve ertapenem (10 µg) disklerine 20 µl hacimde damlatılarak emdirildi. Mueller-Hinton agar plaklarına boronik asit içeren ve boronik asit içermeyen imipenem ve ertapenem diskleri yerleştirildi. 18-24 saat 37 °C'de inkubasyondan sonra inhibisyon zon çapları karşılaştırıldı. Boronik asit içeren disklerin etrafındaki zon çapında, boronik asit içermeyenlerinkine göre 5 mm veya daha fazla artış olması pozitif sonuç olarak

yorumlandı (87, 88). Pozitif kontrol suş olarak daha önce dizileme yöntemi ile KPC pozitif olduğu doğrulanmış klinik suş kullanıldı.

3.2.3. Gradient Test Yöntemi ile Metallo Beta Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi

MHA besiyerine test edilecek bakteri ekimi yapıldıktan sonra bir tarafında imipenem diğer tarafında imipenem/EDTA içeren E test şeritleri yerleştirildi. 18–24 saat 35 derecede inkübasyondan sonra, IMP/EDTA kombinasyonunun MİK değerlerinde imipenem MİK değerine göre 8 kat veya daha fazla artış görülmesi MBL pozitif kabul edildi (89). Pozitif kontrol olarak dizileme yöntemi ile IMP pozitif olduğu doğrulanmış klinik suş kullanıldı.

3.3. Bakteri DNA'sı ekstraksiyonu

Genomik DNA ekstraksiyonu: Kaynatma yöntemi ve promega genomik DNA purifikasyon kit kullanılarak yapıldı.

3.3.1. Kaynatma yöntemi ile DNA ekstraksiyonu

18- 24 saat 37 °C'de üremesi sağlanan izolatlardan 1-2 koloni steril tek kullanımlık öze yardımıyla 500 µl steril distile su bulunan ependorf tüplerinde süspanse edildi. Tüpler ısıtma bloğunun içerisinde 96 °C'de 10 dakika bekletildikten sonra 13.000 rpm' de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı alındı ve -20 °C'de kullanılıncaya kadar kalıp DNA olarak saklandı.

3.3.2. Kit ile Genomik DNA ekstraksiyonu (Wizard Genomik DNA purifikasyon kit ,Promega)

Bir gece 5 ml LB broth besiyerinde inkübe edilen bakteri kültüründen 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine birer ml aktarıldı. 13.000 rpm'de iki dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı. Ependorf tüplerindeki pelletler üzerine 600 µl nüklei lizis solüsyonu eklendi ve pipet yardımıyla nazikçe karıştırıldı. 80 °C'de 5 dakika inkübe edildi ve sonrasında oda sıcaklığına gelmesi sağlandı. 3 µl RNAaz solüsyonu eklendi ve tüp 2-5 defa ters düz edilerek karışması sağlandı. 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi ve oda sıcaklığına getirildi. 200 µl protein presipitasyon solüsyonu eklendi 20 saniye yüksek hızda vortekslenerek karışması sağlandı. 5 dakika buz içerisinde bekletildi. 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar 600 µl oda sıcaklığında

izopropanol bulunan 1,5 ml'lik ependorf tüplerine aktarıldı. Nazikçe karıştırıldıktan sonra 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldı ve 600 µl oda sıcaklığındaki etanol eklendi. 13.000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve etanol pipet yardımı ile uzaklaştırıldı. Pellet kuruması için oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi. 100 µL DNA rehidratasyon solüsyonu eklendi ve 65°C'de bir saat inkübe edildi. Sonuç olarak izole edilen DNA'ların kalite ve miktar ölçümü 260/280 nm dalga boyunda spektrofotometre kullanarak incelendi. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de saklandı.

3.3.3. Kit ile Plazmit DNA ekstraksiyonu (High pure Plazmid Alter Midi Prep (Invitrogen))

LB (Luria Bertani Broth) besiyerinde 24 saat inkübe edilen suşlar steril tek kullanımlık öze yardımıyla LB broth besiyerine inoküle edildi. Bakteriyel izolatlar LB broth içinde 37 °C'de bir gece su banyosunda bekletildi. Bir gece inkübasyon sonrasında kültürler 50 ml'lik falkon tüplerine 25'er ml aktarıldı. Tüpler 6000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı. 10 ml resüpsansiyon buffer (R3) eklendi. Homojen bir hale gelinceye kadar nazikçe çalkalandı. Tüpler 10'ar ml lizis buffer (L7) eklendi. Oda ısısında 5 dakika bekletildi. 10 ml presipitasyon buffer (N3) eklendi ve ters düz edilerek karıştırıldı. Filtrasyon kolonları tüpler üzerine yerleştirilerek DNA wash buffer (W8) ile (10 ml ve 20 ml) iki defa yıkandı. Kolonlar 15 ml'lik steril falkon tüpleri üzerine alındı. Kolon üzerine 5 ml elüsyon buffer (E4) eklendi. Süzülen DNA 633'şer µl olarak mikrosantrifüj tüplerine dağıtıldı. Üzerlerine 583 µl isopropanol eklendi. 15.000 rpm'de 4 °C'de 30 dakika santrifüj edildi., süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 500 µl etanol ile süspense edildi. 4°C'de 15.000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet 200 µl TE ile süspense edildi. Elde edilen DNA'lar -20 °C'de kullanılıncaya kadar saklandı.

3.4. Agaroz jelin Hazırlanması

5X Tris-Borik asit-EDTA (TBE) hazırlanması; 54 gr Tris-Base, 27,5 gr borik asit 20 ml 0,5 M EDTA distile su ile 1 litreye tamamlandı. 105 ml 5X TBE ve 945 ml distile su karıştırılarak 0,5X TBE hazırlandı.

Agaroz jel için 1 gr agar (Sigma) tartıldı, üzerine 100 ml 0.5X TBE ilave edildi. Mikrodalga fırında berraklaşınca kadar ısıtıldı. Biraz soğuyunca Gel red (biotium) 5 µl/100 ml ilave edildi. Solüsyon biraz daha soğuduktan sonra agaroz tabağına döküldü,

taraklar yerleştirildi ve 20 dakika bekletildi, tarak dikkatlice çıkarılarak, agaroz jel 0,5X TBE içeren tanka yerleştirildi.

3.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Karbapenemaz kodlayan genlerin varlığı PZR yöntemi ile araştırıldı. Sınıf A karbapenemazlardan KPC ve GES sınıf B karbapenemazlardan IMP, VIM, NDM, SPM ve SIM, sınıf D karbapenemazlardan OXA beta laktamaz genleri (OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58 ve OXA-48) spesifik segmentlerini çoğaltan spesifik primerlerle araştırıldı. İlave olarak CTX-M, TEM, SHV beta laktamazlar ve plazmidik AmpC beta laktamazlar PZR yöntemi ile araştırıldı. Plazmitler plazmit transfer ve PZR temelli replikon tiplendirmesi ile belirlendi.

3.4.1.1. PZR ile Sınıf D Karbapenemaz (OXA-23, OXA24, OXA51, OXA-58 ve OXA-48) ve Sınıf A Karbapenemaz (KPC ve GES) Genlerinin Belirlenmesi

Amplifikasyon karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde; 10x PCR Buffer (5µl) DNA 2µL, primer A (10 pmol), distile su 26 µl, MgCl₂ 5µl (2,5 mM) 2 mM içeren dNTP karışımından 10 µL, Taq DNA polimeraz 5 µL (5 U/µL) kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon programı 95 °C’de 5 dakika; 94 °C’de 45saniye, 56 °C’de 45saniye, 72 derecede 1 dakika, toplam 35 döngü ve 72°C’de 7 dakika son ekstansiyon olacak şekilde uygulandı (Techne). Amplifikasyon işleminden sonra amplifikasyon ürünleri % 1 agoroz jelde 100 V da 30 dakika yürütüldü. Marker olarak Hae III ladder kullanıldı (69). Sınıf A ve D karbapenemazların tespitinde kullanılan primerler tablo 4’te verilmiştir.

Tablo 4: Sınıf A ve Sınıf D karbapenemaz genlerinin tespitinde kullanılan primerler:

Primer	Nükleotid dizisi (5'-3')	Kaynak	Amplikon büyüklüğü (bp)
OXA-48-A	TTGGTGGCATCGATTATCGG	(69)	710
OXA-48-B	GAGCACTTCTTTGTGATGGC		
OXA-23-F	GATCGGATTGGAGAACCAGA	(90)	501
OXA-23-R	ATTTCTGACCGCATTTCCAT		
OXA-24-F	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	(91)	825
OXA-24-R	AGTTGAGCGAAAAGGGGATT		
OXA-51-F	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	(90)	553
OXA-51-R	TGGATTGCACTTCATCTTGG		
OXA-58-F	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	(91)	453
OXA-58-R	CCCCTCTGCGCTCTACATAC		
KPC-F	ATGTCACGTATCGCCGTC	(92)	785
KPC-R	TTACTGCCCCGTTAACGCC		
GES – CAS A	ACAAAGATAATTTCCATCTCAAGGGAT	(123)	860
GES- CAS B	GTTTTAGACGGGCGTCAACT		

3.4.1.2. PZR ile Sınıf B Metallo Beta Laktamazların Saptanması

Amplifikasyon karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde; 10x PCR Buffer (5µl) DNA 2µL, primer A (10 pmol), distile su 26µl, MgCl₂ (2,5 mM) 5µl, 2 mM içeren dNTP karışımından 10 µL, Taq DNA polimeraz 5 µL (5 U/µL) kullanılarak hazırlandı.. Amplifikasyon programı 94 °C’de 5 dakika, takiben 94 °C’de 30 saniye, 52 °C’de 40 saniye, 72 °C’de 50 saniye toplam 35 döngü, son olarak 72 °C’de 5 dakika son ekstansiyon olacak şekilde uygulandı (93). Amplifikasyon ürünleri %1 agoroz jelde 100 V da 30 dakika yürütüldü. Marker olarak Hae III leadder kullanıldı.

Tablo 5: Metallo beta laktamaz tespitinde kullanılan primerler

Primer	Nükleotid dizisi
VIM-1-R	CTACTCGGCGACTGAGCGAT
VIM-1-L	ATGTTAAAAGTTATTAGTAGT'
IMP-G	AACCAGTTTTGCTTACYAT
IMP-Y	CGGCCCKAGGAGMGKCTTT
NDM-F	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT
NDM-R	GAGCCCGTTTTATGGACCCA
NDMorf-F	ACTAGGCCTCGCATTTGCGG
NDMorf-R	GGTGACGTGGTCAGCCATGG
SIM 1-F	TACAAGGGATTGCGCATCG
SIM 1-R	TAATGGCCTGTTCCCATGTG
SPM-F	CTGCTTGGATTGATGGGCGC
SPM-R	CCTTTCCGCGACCTTGATC

3.4.1.3. PZR ile CTXM ve TEM, SHV Grubu Beta Laktamazların saptanması

Amplifikasyon PCR karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde, 10x PCR buffer 100 µM, 50 pmol primer 1, 50 pmol primer 2, 10 mM dNTP, 2,5 mM MgCl₂ ve 2,5 ünite Taq DNA polimeraz kullanılarak hazırlandı. Amplifikasyon programı; 95°C'de 5 dakika 95 °C'de 45 saniye, 67 °C'de 45 saniye, 72°C'de 45 saniye toplam 35 siklus, son olarak 72 °C'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon ürünleri %1 agaroz jelde 100 V' da 30 dakika yürütüldü (94). CTXM grubu beta-laktamazların tespitinde kullanılan primerler tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6: CTXM grubu beta laktamazların tesbitinde kullanılan primer dizileri

Primer	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü(bp)	Referans
CTX-M-1 grup F CTX-M-1 grup R	CGCTTTGCGATGTGCAG TAGAATTAATAACCGTCGGT	415	(95)
CTXM-2 grup F CTXM-2 grup R	CGACGCTAC CCCTGC TAT T CCAGCGTCAGATTTT TCA GG	552	(95)
CTXM-8 grup F CTXM-8 grup R	TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	666	(95)
CTXM-9grup F CTXM-9grup R	CAA AGA GAG TGC AACGGATG ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC	205	(95)
CTXM-25 grupF CTXM-25 grupR	GCA CGA TGA CAT TCG GG AAC CCA CGA TGT GGG TAG C	325	(95)
TEM F TEM R	CAGCGGTAAGATCCTTGAGA ACTCCCGTCGTGTAGATAA	643	(96)
SHV F SHV R	GGCCGCGTAGGCATGATAGA CCCGGCGATTTGCTGATTTC	714	(96)

3.4.1.4. Plazmit kaynaklı Amp C genlerinin PZR yöntemi ile araştırılması

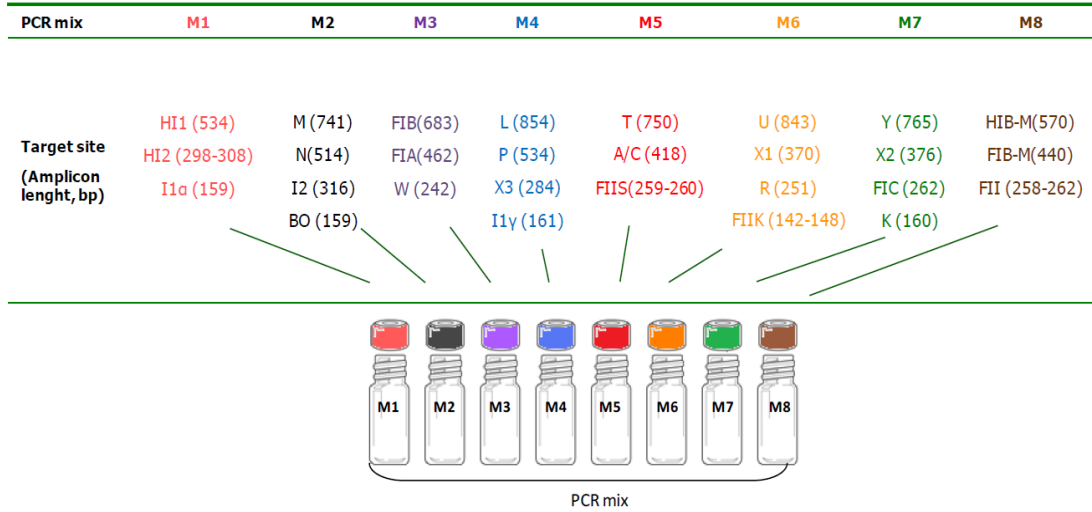
Amplifikasyon programı, 94 °C’de 3 dakika; 94 °C’de 30 saniye, 64 °C’de 30 saniye, 72°C’de 1 dakika 35 siklus, son olarak 72°C’de 7 dakika olacak şekilde uygulandı. Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jelde herbir kuyucuğa 10 µl amplifikasyon ürünü yüklenerek, 100 V ve 400 mA akımda, 50 dakika yürütüldü. Marker olarak Hae III leadder kullanıldı. Süre sonunda bantlar UV ışık altında görüntülendi (97). Plazmit kaynaklı AmpC genlerinin tespitinde kullanılan primerler tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Plazmit kaynaklı Amp C genlerinin tespitinde kullanılan primerler

Primer dizisi : (5'→3')	Amplikon büyüklüğü(bp)	Referans
MOXMF: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT MOXMR: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520	(97)
CITMF: CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC CITMR: AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA	462	(97)
DHAMF: TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC DHAM R: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG	405	(97)
ACCMF: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT ACCMR : TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346	(97)
EBCM F: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG EBCM R: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302	(97)
FOXMF: AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G FOXMR: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190	(97)

3.4.1.5. PBRT (PZR Temelli Replikon Tiplendirmesi)

K. pneumoniae suşlarındaki 25 ayrı replikonun varlığı (HIB, HI2, I1, X2, L/M, N, FIA, FIB, W, Y, P, FIC, A/C, T, FIIS, FII, K/B, BO, R, O) içinde 8 multiplex PZR bulunduran PBRT kiti ile incelendi (28).



Şekil 7: Replikonları karışımlara göre dağılımı ve amplicon uzunlukları

Her bir multiplex PZR için amplifikasyon karışımı son hacim 25 µl olacak şekilde, 23,8 µl mix, 0,2 µl Taq polimeraz, 1 µl DNA ile hazırlandı. Amplifikasyon programı, 95°C’de 10 dakika; 30 döngü; 95 °C’de 60 saniye, 60 °C’de 30 saniye, 72 °C’de 60 saniye ve son döngü 72 °C’de 5 dakika olarak ayarlandı. Amplifikasyon ürünleri %2 agaroz jelde herbir kuyucuğa 10 µl amplifikasyon ürünü yüklenerek, 100 V ve 400 mA akımda, 50 dakika yürütüldü. Marker olarak Hae III ladder kullanıldı (28). Süre sonunda bantlar UV transluminatör kullanılarak görüntülendi.

3.4.1.6. Plazmit Replikonlarının Simpleks PZR ile Araştırılması

Amplifikasyon karışımı son hacim 50 µl olacak şekilde 5 µl 10x PCR buffer, 3 µl MgCl₂, 1 µl dNTP karışımı (10 mM), 20 pmol konsantrasyonda 0,5’şer µl primer FW ve primer RW ve Taq polimeraz 0,25 µl (5 U/µL) kullanılarak hazırlandı. Plazmit analizinde kullanılan primerler tablo 8’de verilmiştir (28). Plazmit analizinde kullanılan pozitif kontrol suşlar tablo 9’da verilmiştir.

Tablo 8: Plazmit analizinde kullanılan primerler (28).

Primer	Nükleotid dizisi	Amplikon Büyüküğü	Referans
FII FW	5'-CTGATCGTTTAAGGAATTTT-3'	258-262	(30)
FII RV	5'-CACACCATCCTGCACTTA-3'		
K/BF	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'	160	(28)
K RV	5'-TCTTTCACGAGCCCGCAA-3'		
R FW	5'-TCGTTTATTCTGCTTCAGC-3'	251	(98)
R RV	5'-GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA-3'		
UFW	5'-TCACGACACAAGCGCAAGGG-3'	843	(98)
URW	5'-TCATGGTACATCTGGGCGC-3'		
HI2 FW	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'	644	(28)
HI2 RV	5'-GGCTCACTACCGTTGTCATCCT-3'		
I1 FW	5'-CGAAAGCCGGACGGCAGAA-3'	139	(28)
I1RV	5'-TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT-3'		
L/MFW	5'-GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG-3'	785	(28)
L/M RV	5'-CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG-3'		
N FW	5'-GTCTAACGAGCTTACCGAAG-3'	514	(28)
N RV	5'-GTTTCAACTCTGCCAAGTTC-3'		
FIA FW	5'-CCATGCTGGTTCTAGAGAAAGGTG-3'	462	(28)
FIA RV	5'-GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG-3'		
FIBFW	5'-TCTGTTTATTCTTTACTGTCCAC-3'	683	(30)
FIB RV	5'-CTCCGTCGCTTCAGGGCATT-3'		
W FW	5'-CCTAAGAACAAAGCCCG-3'	242	(28)
W RW	5'-GGTGCGCGGCATTAGGAACCGT-3'		
Y FW:	5'-AARRCAACAACACTGTGCAGCCTG-3'	765	(28)
Y RW	5'-GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT-3'		
P FW:	5'-GTGAAGTGGCAGATGAGGAAGG-3'	534	(28)
P RW:	5'-TTCTCCTCGTCGCCAACTAGAT-3'		
A/C FW:	5'-GAGGAACCAAGACAAAGACCTGGA-3'	471	(28)
AC2 RV:	5'-CCCATCTTCGAGAGCTCTTTCTG-3'		
T FW:	5'-TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT-3'	750	(28)
T RW:	5'-CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC-3'		
FIIS FW:	5'-CTAAGAATTTTGATGGCTGGC-3'	259-260	(28)
FIIS RV:	5'-CAGTCACTTCTGCCTGCAC-3'		
K/B FW	5'-GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC-3'		
B/O RW	5'-TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA-3'		
HIBF New	5'-ATTCCAGAAAACCGATCTCTTT-3'		
HIBRV	5'-AATCATTGGTGTGGGATCGTTT-3'		

Tablo 9: Plazmit analizinde kullanılan pozitif kontrol suşlar

Replikon	Pozitif Kontrol Suş
HI1	<i>Salmonella typhi</i> R27 <i>Citrobacter freundii</i> pNDM-CIT
HI2	<i>Serratia mercenscens</i> R478
A/C	<i>Aeromonas hydrophila</i> pRA 1
I1	<i>S.enterica</i> Typhimurium R64
I2	<i>Escherichia coli</i> R721
L/M	<i>Citrobacter freundii</i> Pctx-M3
N	<i>Escherichia coli</i> R46
K	<i>Escherichia coli</i> R387
B/O	<i>Esheria coli</i> p3521
W	<i>Escherichia coli</i> R721
P	Inc—alphaplasmid
T	<i>Proteus vulgaris</i> Rts1
U	<i>Aeromonas hydrophila</i> RA3
R	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Pk245
Y	<i>Enterobacteria</i> phage P7
X1	<i>Esheria coli</i> pOLA52
X2	<i>Esheria coli</i> R6K
HIB-M	pNDM-MAR
FIB-M	pNDMMAR
FI-A	Plasmid F
FI-C	Plasmid F
FII	<i>Esheria coli</i> NR1
FIIS	<i>S.enterica</i> Typhimurium pLST
FIK	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPN3

3.4.1.7. Plazmit Transformasyon Deneyi

Plazmitlerin transformasyonu Max Efficiency DH5alpha Component cells (Invitrogen) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapıldı. 100 µl component hücre üzerine 2 µl DNA eklendi. 30 dakika buzda inkübe edildi. Süre sonunda 45 saniye çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Süre sonunda ikinci defa buzda 2 dakika inkübe edildi. Transformant hücrelerde plazmitlerle aktarılan direnç genlerinin varlığı simpleks ve multipleks PCR teknikleri kullanılarak bakıldı. 0,9 ml S.O.C medium (S.O.C medium: %2 tryptone, %0,5 yeast extract, 10 mM sodyum

klorür, 10 mM magnezyum klorür, 10 mM Magnezyum sülfat, 20 mM glukoz). Çalkalamalı etüvde 37°C'de 225 rpm hızda bir saat inkübe edildi. Transformant hücreler 100 µg/ml ampisilin ve X-gal (X-gal; component hücrelerdeki beta galaktozidaz aktivitesine bağlı mavi renk değişimini gözlemlemek için kullanıldı) içeren LB agar besiyerlerine inoküle edildi ve 37 derecede bir gece inkübasyondan sonra transformant hücreler seçildi.

3.5. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) Yöntemi

PFGE yöntemi için kullanılacak tamponların hazırlanışı;

3.5.1. 1 M Tris Tamponu:

12.11 gr Tris base (Merck, ABD) tartıldı. Toplam hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı, pH 8 olarak ayarlandı.

3.5.2. 1 M Tris-HCl Tamponu

15.67 gr Tris (hidroksimetil) aminometan hidroklorür (Fisher Scientific, ABD) tartıldı, toplam hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı. pH 8 olacak şekilde ayarlandı.

3.5.3. Bakteri Süspansiyon Tamponu (CSB)

1 M Tris tamponundan (pH 8) 10 ml, 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma-Aldrich, Almanya) çözeltisinden 20 ml alındı toplam hacim ultra saf su ile 100 ml'ye tamamlandı.

3.5.4. Lizis Tamponu hazırlanışı

4,5 ml 0.5 M EDTA (pH 8) çözeltisinden, 0,5 ml %10 Na-lauril sarkozin çözeltisi falkon tüpü içerisinde karıştırıldı, mikrosantrifüj tüplerine 800'er µl aktarıldı. Her bir mikrosantrifüj tüpüne 100 µl 10 mg/ml konsantrasyondaki lizozim enzimi (Sigma-Aldrich, Almanya), 100 µl 10 mg/ml konsantrasyondaki Proteinaz K (Sigma-Aldrich, Almanya) enzimi ve 2 µl 2 mg/ml konsantrasyondaki RNAz (Biomatik, ABD) enzimi eklendi. Enzimler aktivitelerini kaybetmemeleri için belirtilen konsantrasyonlarda taze olarak hazırlanarak kullanıldı.

3.5.5. PFGE için agaroz plaklarının hazırlanması

-80 °C'de muhafaza edilen suşlardan triptik soy broth agar besiyerine pasaj alındı ve bir gece inkübe edildi. Ertesi gün PFGE için kullanılmak üzere tek koloniden

saf kültür yapıldı. Agar besiyerinde üremiş olan bakteri kültüründen öze yardımıyla 1-2 koloni alınarak 5 ml triptik soy broth besiyerinde 37°C’de bir gece çalkalamalı etüvde (Gerhardt, Thermoshake) 60 rpm’de inkübe edildi. Bir gecelik inkubasyon sonrası bakteri kültür yoğunlukları (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech) UV spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüldü. PFGE için kullanılacak son konsantrasyonların 1 absorbans değerinde olması sağlandı. 1 gece inkubasyon sonrası 1,5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine 1,2 ml aktarıldı ve 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı, pellet 13.000 rpm’de 15 saniye daha santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 500 µl CSB çözeltisi ilave edildi ve tüpler vortekslendi. 13.000 rpm’de tüpler santrifüj edildi, süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet üzerine 1000 µl CSB çözeltisi ilave edildi ve vortekslendi. Tüpler 55°C’ye ayarlı ısı bloğunda 15 dakika bekletildi. Önceden 55 °C’de bekletilmiş sıvı kıvamlı %2’lik düşük erime ısıli agarozdan (low melting agaroz) ve bakteri süspansiyonundan 150’şer µl alınarak temiz bir mikrosantrifüj tüpünde karıştırıldı. Karışımdan 100 µl alınarak agaroz plug’ına döküldü. Agaroz +4°C’de 30 dakika bekletildi. Donmuş agaroz plaklar 1000 µl lizis solüsyonu bulunan mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Tüpler 55 °C su banyosunda bir gece inkübe edildi. Bir gece inkubasyon sonrası agaroz plaklar 50 ml’lik falkon tüplerine aktarıldı. 55°C’lik su banyosunda bekletilmiş ultra saf su ve TE-10 solüsyonu ile 15’er dakika aralıklarla 3’er kez yıkandı. Agaroz plaklar bistüri ile ortadan kesilerek yarıları mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine 15 µl XbaI Buffer (Thermo Scientific, ABD) ve 135 µl ultra saf su ilave edilerek, 15 dakika oda ısında inkübe edildi. Sıvı agaroz bloklara zarar vermeden pipet yardımıyla boşaltıldı ve üzerlerine 85 µl ultra saf su, 10 µl 10X XbaI tamponu ve 5 µl XbaI enzimi (10 U/µl) ilave edildi. Agaroz bloklar enzimli solüsyon içerisinde 37°C’de bir gece inkübe edildi. Elektroforez tırağını 1,7vr 15. dişlerine lambda PFG ladder (Biolabs, ABD) diğeri dişlerine test edilecek bakteri kromozomlarını içeren agaroz bloklar yerleştirildi. Elektroforez tırağı kasete yerleştirildikten sonra %1’lik konsantrasyonda (Pulsed Field Certified Agarose, BIORAD) agar ile 0.5X TBE tamponu içinde mikrodalga fırında kaynatıldı ve agarın homojen bir şekilde erimesi sağlandı. 55-60°C’ye kadar soğutulan karışım kasete yavaşça döküldü.

3.5.6. PFGE için elektroforezin uygulanması

CHEF-DR III drive modüle (Bio-Rad Laboratories Ltd. Hemel Hempstead, İngiltere) cihazı içine 2 litre 0.5X TBE tamponu konuldu ve yükleme yapılmadan 2 saat önce çalıştırılarak tamponun 14°C'ye soğutulması sağlandı. Tarak donmuş olan jelden çıkarıldı ve jel elektroforez cihazına yerleştirildi. Başlangıç zamanı 6 saniye, bitiş zamanı 22 saniye, süre 18 saat olarak ayarlandı. 18 saat sonunda jel 1µl/ml etidyum bromür ilave edilmiş 0.5X TBE solüsyonu içinde 30 dakika bekletildi. 30 dakika sonunda jel distile su ile bir kez yıkandı ve bantlar jel görüntüleme sistemi (Carestream 212 PRO GEL IMAGING SYSTEM) ile görüntülendi.

3.5.7. PFGE sonuçlarının değerlendirilmesi

PFGE profilleri GelCompar II (Applied Maths, Belçika) programı kullanılarak değerlendirildi. Dice benzerlik katsayısı 1 olarak alındı. UPGMA (Unweighted Pair Group Method Average) ilişki kuralı kullanıldı (99).

3.6. Tam Genom Dizi Analizi

İzolatlardan pun-drug resistant olan 1 numaralı suşa tam genom ve plazmit dizi analizi uygulandı. Tam genom dizi analizinde Ion Torrent , Whole Genome Machine kullanıldı. Tam genom ve tam plazmit dizileri danışman öğretim üyesi rehberliğinde değerlendirildi.

3.7. Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST) Yöntemi

Bir numaralı *Klebsiella pneumoniae* izolatu genotiplendirilmesi MLST yöntemi ile MLST web sitesinde belirtilen protokole uygun olarak yapıldı. (100-102). Tez için ayrılan bütçe dizileme giderleri için yeterli olmadığından diğer suşların tiplendirilmesinde MLST yerine pulsed field jel elektroforez yöntemi kullanıldı (103). MLST için amplifikasyon karışımının hazırlanması; 25 µL HotStart Taq Master Mix (Qiagen), 100 pmol herbir primerden 5 µl (son konsantrasyon 10 pm) ve distile su 13 µl ile 50 µL'ye tamamlandı. İki µl bakteri DNA'sı ilave edildi. Amplifikasyon programı; 94°C'de 5 dakika; 94 °C'de 30 saniye, 50 °C'de 30 saniye ve 72 °C'de 30 saniye toplam 35 siklus; 72°C'de 5 dakika olarak uygulandı (Not: Bağlanma sıcaklığı gap A için 60 °C, ton B için 45 °C olarak uygulandı) (102).

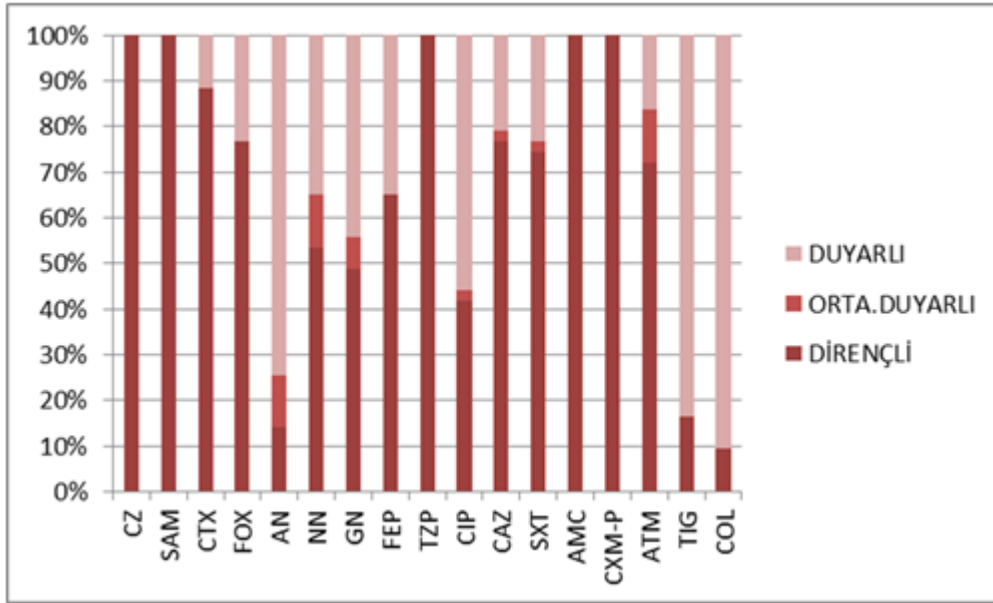
Tablo 10: *Klebsiella pneumoniae* MLST analizi için kullanılan primerler (9).

<i>rpoB</i> : F : Vic3 :	GGCGAAATGGCWGAGAACCA
<i>rpoB</i> : R : Vic2 :	GAGTCTTCGAAGTTGTAACC
<i>gapA</i> : F : 173 :	TGAAATATGACTCCACTCACGG
<i>gapA</i> : R : 181 :	CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT
<i>mdh</i> : F : 130 :	CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG
<i>mdh</i> : R : 867 :	CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG
<i>pgi</i> : F : 1R :	GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC
<i>pgi</i> : R : 1F :	CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT
<i>phoE</i> : F : 604.1 :	ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG
<i>phoE</i> : R : 604.2 :	TGATCAGAACTGGTAGGTGAT
<i>infB</i> : 1F :	CTCGCTGCTGGACTATATTCG
<i>infB</i> : 1R :	CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC
<i>tonB</i> : 1F :	CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT
<i>tonB</i> : 2R :	ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG
<i>infB</i> : 2F :	ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC
<i>pgi</i> : 2F :	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
<i>pgi</i> : 2R :	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT

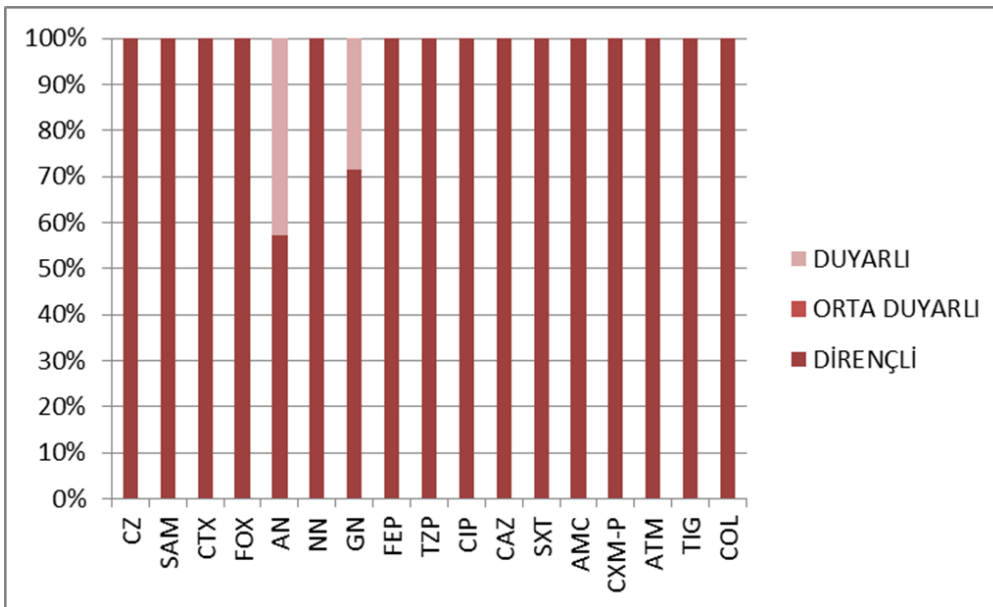
4. BULGULAR

4.1. Antibiyotik Duyarlılık Deneyleri Sonuçları

Antibiyotik duyarlılıkları CLSI önerilerine göre değerlendirildiğinde; suşların hepsi sefazolin, sefuroksim, amoksisilin/klavulonik asit, ampicilin/sulbaktam ve piprerasilin/tazobaktama dirençli bulundu. Sefotaksim direnci %90 (n=45), seftazidim direnci %90 (n=40), sefoksitin direnci %80 (n=40), sefepim direnci %70 (n=35), aztroneam direnci %76 (n=38), amikasin direnci %20 (n=10), tobramisin direnci %60 (n=30), gentamisin direnci %52 (n=26), siprofloksasin direnci %50 (n=25) ve trimetoprim/sulfometaksazol direnci %78 (n=39) olarak bulundu. OXA-48 pozitif izolatların direnç oranları; sefoksitin %76,3, sefotaksim %88,4, seftazidim %76,7, sefepim %65,1, amikasin %14, tobramisin %53,5, gentamisin %48,8, kolistin % 9,3, siprofloksasin %41,9, kotrimaksazol %74,4, aztroneam %72,1, tigesiklin %16,3 olarak bulundu. NDM pozitif izolatlar amikasin ve gentamisin dışında tüm antibiyotiklere dirençli bulundu. Amikasin direnci %57,1, gentamisin direnci ise %71,4 bulundu. OXA-48 pozitif bulunan izolatların disk difüzyon sonuçlarının dağılımı şekil 8 ve Tablo 11’de, NDM pozitif izolatların disk difüzyon sonuçlarının dağılımı şekil 9’da verilmiştir.



Şekil 8: OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* (n=43) suşlarının antibiyotik disk difüzyon deneyleri sonuçları



Şekil 9: NDM pozitif *K. pneumoniae* (n=7) suşlarının antibiyotik disk difüzyon deneyleri sonuçları

Tablo 11: OXA-48 geni taşıyan *K. pneumoniae* suşlarının (n=43) disk difüzyon duyarlılık deneyleri sonuçları

Antibiyotik (disk)	Duyarlı n/%	Orta Duyarlı n/%	Dirençli n/%
Amoksisilin-/Klavulonik Asit	(0 /43) % 0	(0 /43) % 0	(43 /43) %100
Ampisilin/Sulbaktam	(0/43) %0	(0/43) %0	(43 /43) %100
Sefazolin	(0/43) %0	(0/43) %0	(43 /43) %100
Sefuroksim	(0/43) %0	0/43 %0	(43 / 43) %100
Sefotaksim	(5/43) %11,6	(0/43) %0	(38/ 43) %88,4
Seftazidim	(1/43) %2,3	(9/43) %20,9	(33/43) %76,7
Sefepim	(15/43) %34,9	(0/43) %0	(28/43) %65,1
Piperasilin-Tazobaktam	0/%0	0/ %0	(43/43) %100
Sefoksitin	(10/43)%23,3	(0/43) % 0	(33/43) %76,7
Siprofloksasin	(9/43) % 20,9	(1/43) % 2,3	(18/43) %41,9
Amikasin	(32/43)%74,4	(5/43) % 11,6	(6/43) %14
Gentamisin	(9/4)% 20,9	3/43 % 7	(21/43) % 48,8
Tobramisin	(15/43)%34,9	5/43 % 11,6	(23/43) % 53,5
Trimetoprim-Sulfametaksazol	(10/43)%23,3	1/43 % 2,3	(32/43) % 74,4
Aztroneam	(7/43) % 16,3	(5/43) % 11,6	(31/43) %72,1

Karbapenemler için MİK değerleri; ertapenem için 2->32 mg/L, meropenem için 0.5->32 mg/L, imipenem için 0.5->32 mg/L, doripenem için 0.5->32 mg/L arasında bulundu. Karbapenemlerin MİK değerleri (mg/L) ve dağılımları Tablo 14 ve 15’de verilmiştir. MİK₅₀ ve MİK₉₀ (mg/L) değerleri; ertapenem için >32 meropenem 8 ve >32, imipenem için 4 ve 16, doripenem için 16 ve >32 olarak bulundu. İzolatların direnç oranları ertapenem için %92 (46/50), imipenem için %90, doripenem için %74 ve meropenem için %68 olarak saptandı. Karbapenem MİK dağılımları, MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri, direnç oranları Tablo 13, 14’de verilmiştir. NDM pozitif olduğu saptanan yedi izolatın hepsi %100 (n=7) ertapeneme, %85,7’si (n=6) meropeneme, %42,9’u (n=3) imipeneme ve % 71,4’ü (n=5) doripeneme dirençli bulundu. Tüm

K.pneumoniae suşlarının ve NDM pozitif izolatların MİK değerlerinin dağılımı şekil 10 A ve B’de gösterilmiştir.

Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi sonuçları tablo 12’de karşılaştırılmıştır.

Tablo 12: Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması

Karbapenem	Disk difüzyon yöntemi			Mikrodilüsyon yöntemi		
	H	O	D	H	O	D
Ertapenem	-	-	%100 (n=50)	-	%8 (n=4)	%92 (n=46)
Meropenem	%2 (n=1)	%16 (n=8)	%82 (n=41)	%22 (n=11)	%10 (n=5)	%68 (n=34)
İmipenem	%2 (n=1)	%24 (n=12)	%76 (38)	%4 (n=2)	%6 (n=3)	%74 (n=45)

Not: H: Duyarlı, O: Orta Duyarlı, D: Dirençli

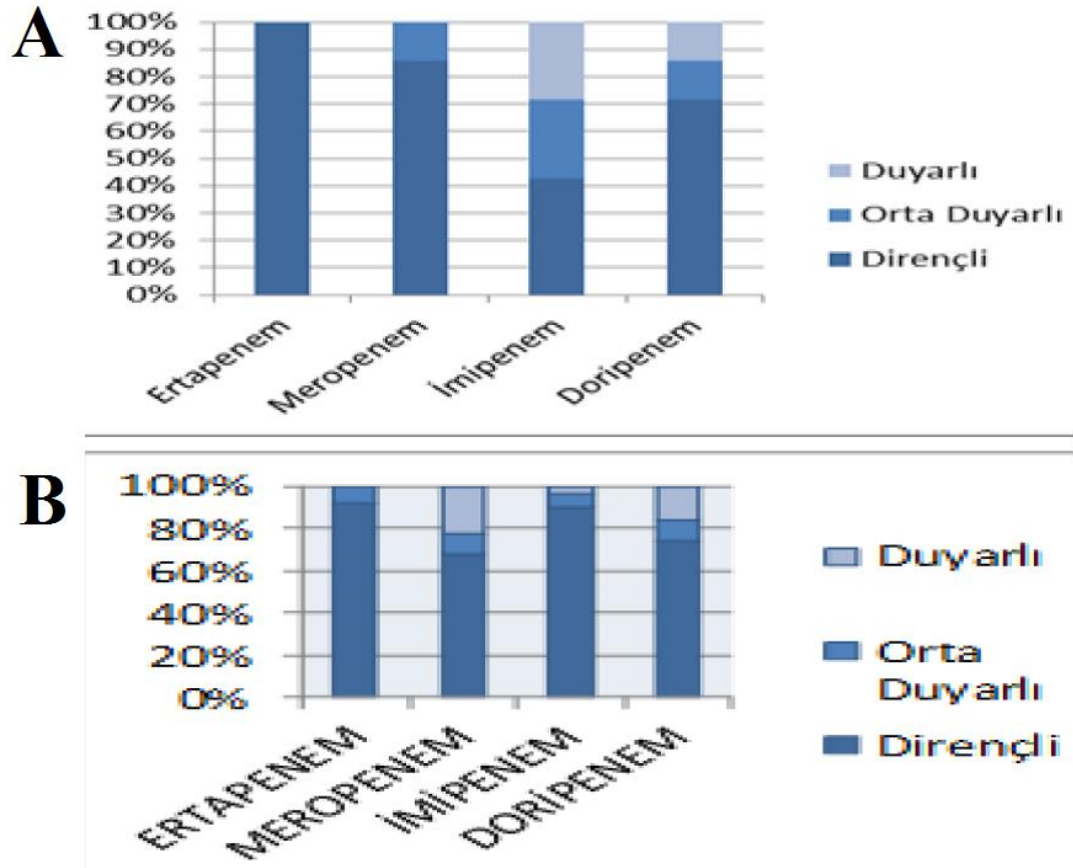
Tablo 13: Karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarının (n=50) karbapenemler için kümülatif MİK değerleri.

	(mg/L)									(mg/L)			n/%	n/%	n/%
Antibiyotik	0.2 5 (n)	0.5 (n)	1 (n)	2 (n)	4 (n)	8 (n)	16 (n)	32 (n)	>32 (n)	MİK aralığı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Ertapenem	-	-	-	4	7	-	3	1	35	2- >32	>32	>32	0 (%0)	4 (%8)	46 (%92)
Meropenem	-	4	7	5	8	4	10	2	10	0.5->32	8	>32	11(%22)	5 (%10)	34 (%68)
İmipenem	-	1	1	3	29	10	2	-	4	0.5->32	4	16	2 (%4)	3 (%6)	45 (%90)
Doripenem	-	4	4	5	3	5	9	2	17	0.5->32	16	>32	8 (%16)	5 (%10)	37 (%74)

CLSI 2014 (104)

Tablo 14: *K. pneumoniae* suşlarının karbapenemler için MİK (mg/L) değerleri

Suş No	Karbapenemaz Tipi	Ertapenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)	İmipenem (mg/L)	Doripenem (mg/L)
1	NDM	128	64	8	>32
2	OXA- 48	3	0.75	4	1
3	OXA- 48	2	6	4	0.75
5	OXA- 48	>32	16	4	16
6	OXA- 48	2	0.50	4	0.50
7	OXA- 48	16	1	4	1.5
8	OXA- 48	1.5	2	4	0.50
10	OXA- 48	>32	32	4	64
12	OXA- 48	1.5	0.36	4	0.50
15	OXA- 48	>32	16	6	>128
18	OXA- 48	4	0.75	4	3
19	OXA- 48	2	0.75	4	8
20	OXA- 48	>32	16	6	24
22	OXA- 48	>32	>32	192	>32
23	OXA- 48	>32	>32	6	>32
24	OXA- 48	>32	8	8	12
25	OXA- 48	>32	24	4	16
26	OXA- 48	>32	12	4	64
27	OXA- 48	>32	2	4	6
29	OXA- 48	>32	3	4	32
30	OXA- 48	>32	6	4	16
31	OXA- 48	>32	2	128	128
33	OXA- 48	>32	>32	6	128
34	OXA- 48	>32	>32	4	128
35	OXA- 48	>32	>32	4	64
36	OXA- 48	>32	16	6	64
39	OXA- 48	>32	4	4	16
40	OXA- 48	>32	4	4	32
41	OXA- 48	>32	4	4	2
43	OXA- 48	>32	6	6	16
44	OXA- 48	>32	4	4	16
45	OXA- 48	>32	>32	12	64
46	OXA- 48	4	1.5	4	8
47	OXA- 48	>32	4	4	16
49	OXA- 48	>32	16	4	128
50	OXA- 48	16	1	0.38	4
52	OXA- 48	4	0.5	4	0.5
53	OXA- 48	16	1	8	8
54	OXA- 48	4	0.5	4	4
55	OXA- 48	>128	>32	48	>128
66	OXA-48	4	1	4	1.5
69	NDM	>32	4	0.75	>128
70	NDM	24	4	2	>128
72	NDM	>32	>32	>32	>128
73	NDM	192	1,5	0.50	1
74	NDM	>32	16	1,5	2
75	OXA-48	64	>32	16	16
76	OXA-48	>32	16	3	6
77	NDM	512	12	8	>32
78	OXA-48	128	16	1.5	2
KP NEKAS	OXA-48	>32	3	4	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	-	0.047	0.012	0.06	0.75



Şekil 10: A; Tüm *K. pneumoniae* suşlarının (n=50) MİK (mg/L) değerlerinin dağılımı.

B; NDM tipi karbapenemaz taşıyan *K. pneumoniae* suşlarının (n=7) MİK (mg/L) değerlerinin dağılımı.

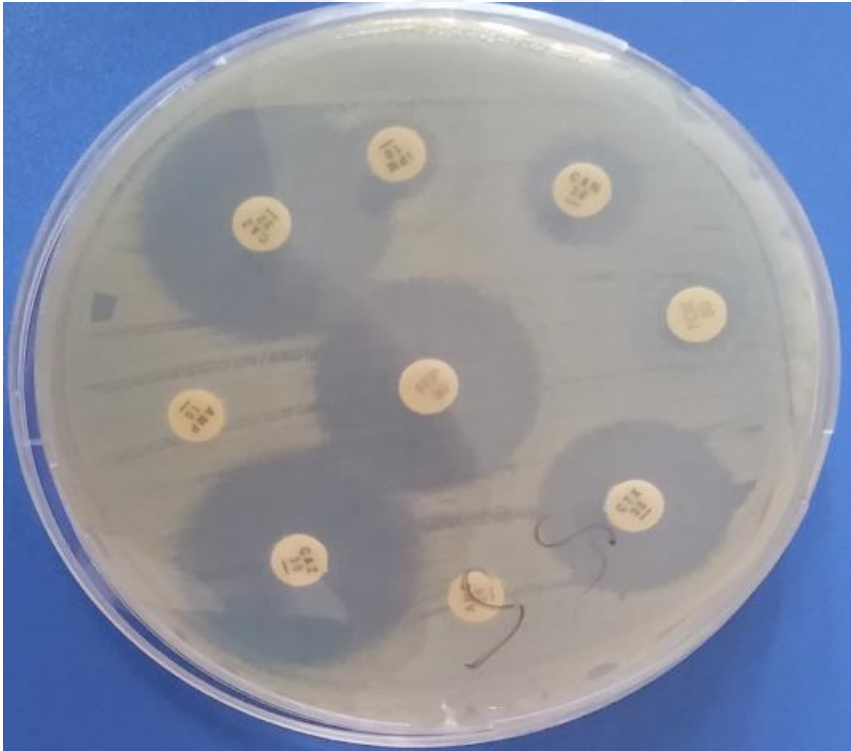
Tablo 15: OXA-48 ve NDM pozitif izolatların karbapenem direnç oranlarının karşılaştırılması.

Karbapenem	OXA-48 (n=43)			NDM (n=7)		
	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli	Duyarlı	Orta Duyarlı	Dirençli
Ertapnem	%0 (n=0)	%4,7 (n=2)	%95,3 (n=41)	%0 (n=0)	%0 (n=0)	%100 (n=7)
Meropenem	%23,3 (n=10)	%14 (n=6)	%62,8 (n=27)	%0 (n=0)	%4,3 (n=1)	%85,7 (n=6)
İmipenem	%2,3 (n=1)	%4,7 (n=2)	%93 (n=40)	%28,6 (n=2)	%42,8 (n=3)	%28,6 (n=2)
Doripenem	%14 (n=6)	%11,6 (n=5)	%74,4 (n=32)	%14,3 (n=1)	%28,6 (n=2)	%57,1 (n=4)

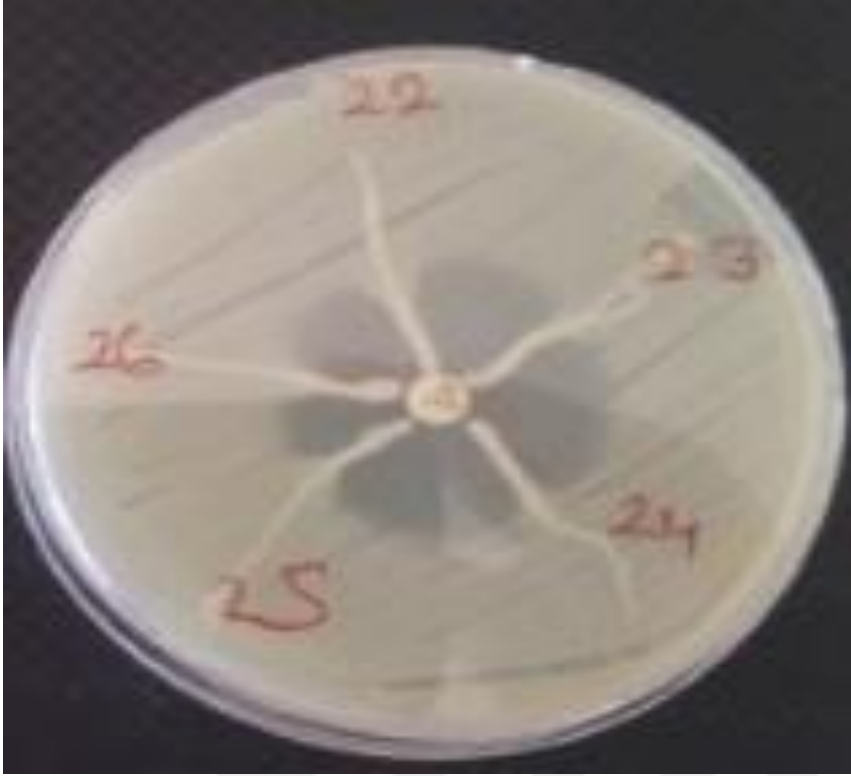
Elli *K. pneumoniae* suşunun 38 (%76)'inde çift disk sinerji testi pozitif bulundu ve GSBL pozitif olarak kabul edildi. Pozitif test sonucu ve negatif test sonucu örneği şekil 11 ve 12'de verilmiştir. Suşların tümünde ertapenem ve imipenem ile ayrı ayrı yapılan modifiye hodge testi suşların tümünde pozitif bulunmuştur (%100). Pozitif MHT örneği şekil 13'de verilmiştir. İzolatlar %26 (n=13)'sı ertapenem ile yapılan boronik asit testinde pozitif sonuç verirken, %14 (n=7)'ü imipenem ile yapılan boronik asit testinde pozitif sonuç vermiştir. İzolatların %10 (n=5)'nda her iki antibiyotikle aynı anda pozitif sonuç elde edilmiştir. OXA-48 pozitif izolatın %23,3 (10/43)'ü ertapenem ile yapılan boronik asit testiyle pozitif sonuç verirken, %9,3 (4/43)'ü imipenem ile yapılan boronik asit testinde pozitif sonuç vermiştir (Ertapenemli boronik asit testinde duyarlılık %56,5, imipenemli boronik asit tetinde duyarlılık %52 olarak hesaplanmıştır). NDM pozitif izolatların %42,9 (4/7)'u ertapenemli boronik asit testi ile, %42,9 (4/7)'u imipenemli boronik asit testi ile pozitif sonuç vermiştir (ertapenemli ve imipenemli boronik asit testlerinin her ikisinde de duyarlılık %63,6 bulunmuştur. Pozitif boronik asit çift disk sinerji testi örneği şekil 14'de verilmiştir. Metallo beta laktamaz aktivitesini değerlendirmek için kullanılan MBL E test yönteminde OXA-48 veya NDM tipi karbapenemaz taşıyan suşların hiçbirinde pozitiflik saptanamamıştır. Şekil 15'de MBL E test örneği verilmiştir.



Şekil 11: *K.pneumoniae* (7 no'l'u suş) suşunda GSBL pozitif çift disk sinerji testi sonucu örneği.



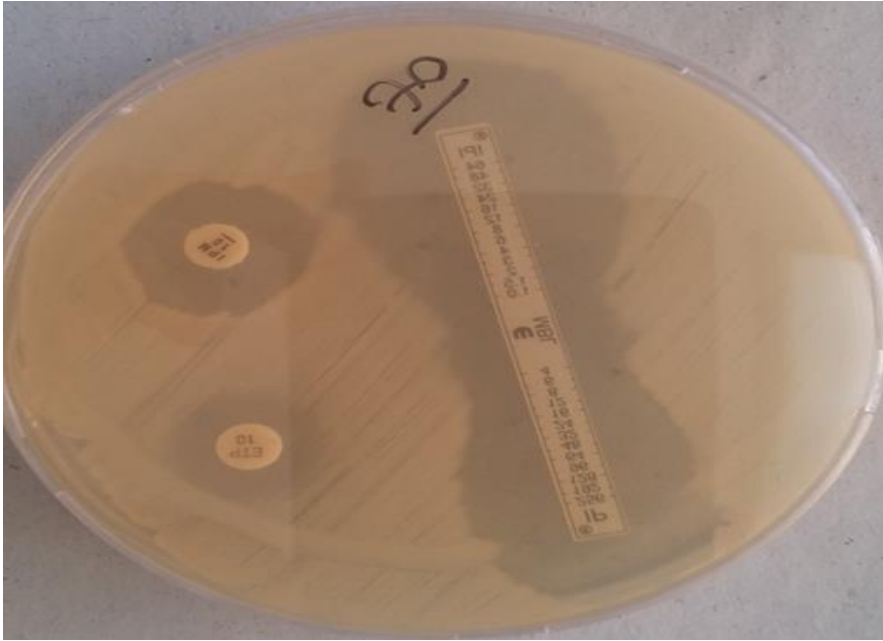
Şekil 12: *K.pneumoniae* (55 no'lu suş) GSBL negatif çift disk sinerji testi sonucu örneği.



Şekil 13: *K.pneumoniae* suşlarında (22, 23, 24, 25, 26 nolu'lu suşlar) pozitif Modifiye hodge testi sonuçları örneği.



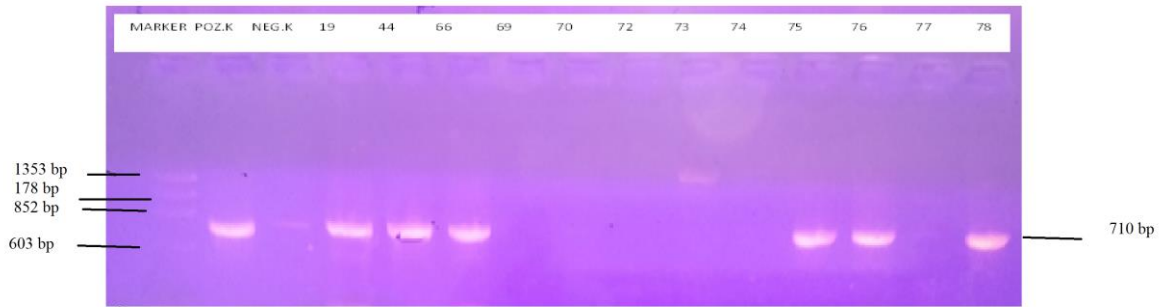
Şekil 14: *K.pneumoniae* suşlarında (3 ve 5 no'lu suşlar) pozitif Boronik asit çift disk sinerji testi sonucu örneği.



Şekil 15: *K.pneumoniae* (70 no'lu suş) suşunda MBL E test (IMP/IP-EDTA) ile negatif test sonucu örneği.

4.2. PZR Yöntemi Sonuçları

Toplam 50 *K. pneumoniae* izolatının %86 (n=43)'sı OXA-48 tipinde karbapenemaz geni taşıırken, %14 (n=7)'nün NDM tipinde karbapenemaz taşıdığı tespit edildi. OXA-48 geni PZR yöntemi ile araştırılırken elde edilen jel görüntüsü şekil 16'de verilmiştir. Sınıf A karbapenemazlardan KPC ve GES, sınıf B karbapenemazlardan IMP, VIM, SPM, SIM, sınıf D karbapenemazlardan OXA-23, OXA24, OXA51, OXA-58 genleri saptanmadı. Suşların %62 (n=31)'sinde TEM, %78 (n=39)'inde SHV, %50 (n=25)'sinde CTXM-1 ve %10 (n=5)'nunda CTXM-2 tipi beta laktamaz tespit edildi. Kolistine dirençli olan bir numaralı suşun CTXM PZR amplifikasyon ürününün dizi analizi sonucunda CTXM-15 tipi beta-laktamaz olduğu tespit edildi. Suşların %42 (n=21)'sinde CTXM -1 ve SHV, %56 (n=28)'sında TEM ve SHV, %38 (n=19)'inde CTXM-1 ve SHV, %36 (n=18)'sında TEM, SHV, CTXM-1, %10 (n=5)'nunda CTXM-1 ve CTXM-2 tipi beta laktamaz birlikte saptanmıştır. Bu çalışmada 66, 69, 76, 77 ve 78 no'lu suşlar, NDM veya OXA-48 genleriyle birlikte SHV, CTX-M-1 ve CTX-M-2 grubu direnç genlerini taşıyan hibrit suşlar olarak tanımlandılar. Suşların hiçbirinde plazmidik AmpC genleri (FOX, CIT, MOX, DHA, ACC ve EBC) bulunmamıştır. Şekil 16 ve 17'de PZR amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki bant görüntülerine örnekler verilmiştir.



Şekil 16: PZR yöntemi ile OXA-48 pozitif *K.pneumoniae* suşlarının amplifikasyon ürünlerinin agaroz jeldeki bant görüntüleri. Sütun 1; M: Marker ϕ X174 Hae III, sütun 2: pozitif kontrol, sütun 3: negative kontrol, sütun 4, 5, 6, 12, 13, 15: 19, 44, 66, 75, 76, 78 nolu OXA-48 pozitif suşlar.



Şekil 17: PZR yöntemi ile CTXM-1 grubu pozitif amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri. Sütun 1: Marker, sütun 2: pozitif kontrol, sütun 3: negative kontrol, sütun 4, 6, 8, 9, 11, 16, 17, 18: CTXM-1 pozitif 5, 7, 15, 18, 19, 20, 23, 24 no'lu suşlar.

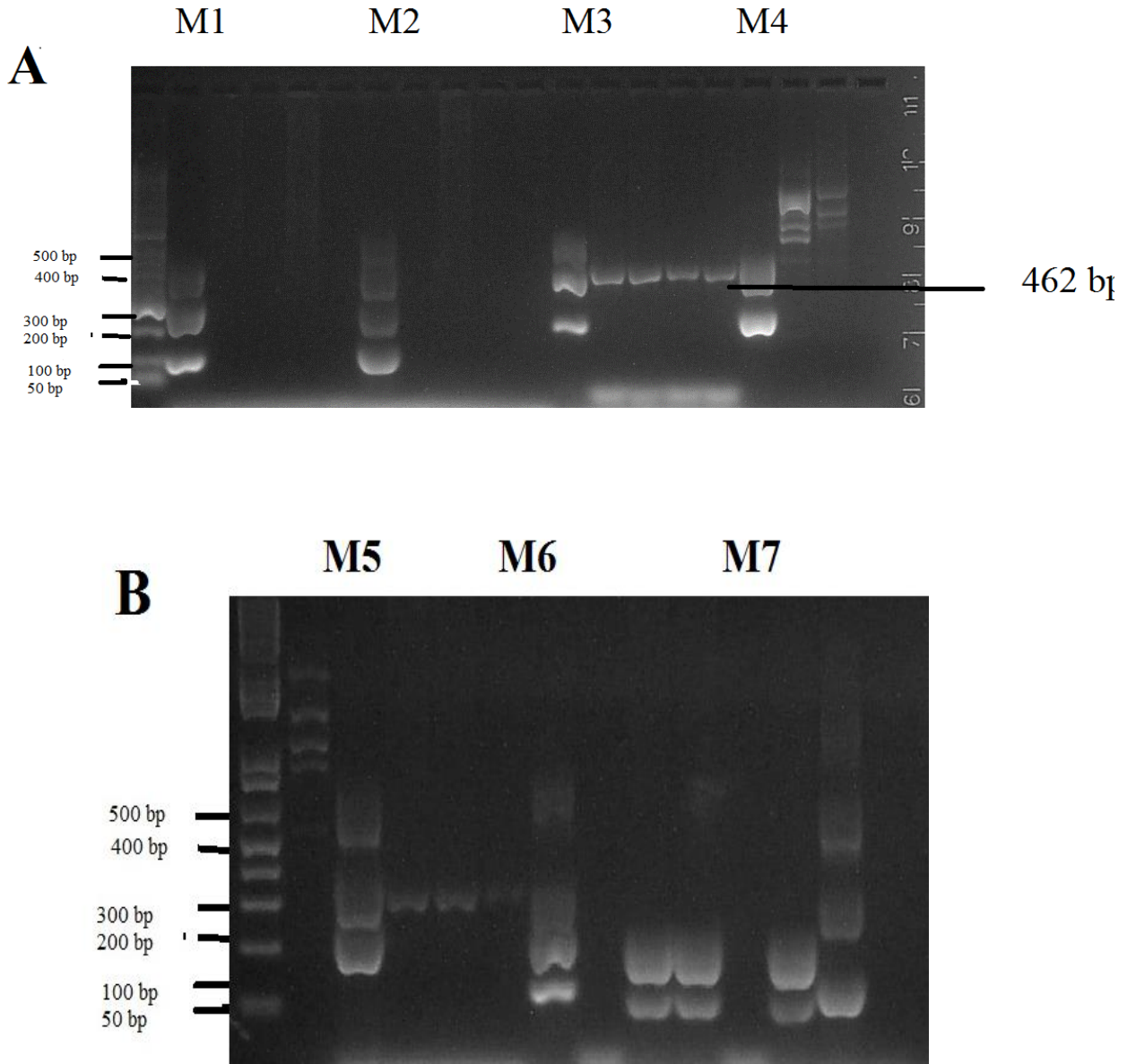
4.3. Plazmit Analizi Sonuçları

Plazmit tanısına yönelik olarak uygulanan PBRT yöntemi ve simpleks PZR deneylerinde 50 izolatin %50 (n=25)'sinde IncR tipi replikon saptanırken, %40 (n=20)'nda IncA/C tipi, %18(n=9)'inde IncFIIK tipi replikon saptandı. IncA/C simpleks PZR görüntüleri ve PBRT görüntülerine örnekler şekil 18 ve 19'da verilmiştir.

Suşlarda simpleks PZR yöntemi ile de araştırılan IncL/M, IncH1, IncP ve IncT tipi replikonlara rastlanmamıştır. On suş plazmit tiplendirme yöntemleri ile tiplendirilememiştir. Suşlara ait plazmit replikon tipleri Tablo 17'de verilmiştir.



Şekil 18: IncA/C tespitine yönelik yapılan simpleks PZR yöntemi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin % 2 agaroz jelde UV ışık altındaki bant görüntüleri. Sütun 1: Marker, ϕ X174 DNA Marker Hae III Digest, sütun 2: Negatif kontrol, sütun 3: Pozitif kontrol, sütun 6, 7, 10, 11: IncA/C pozitif suşlar.



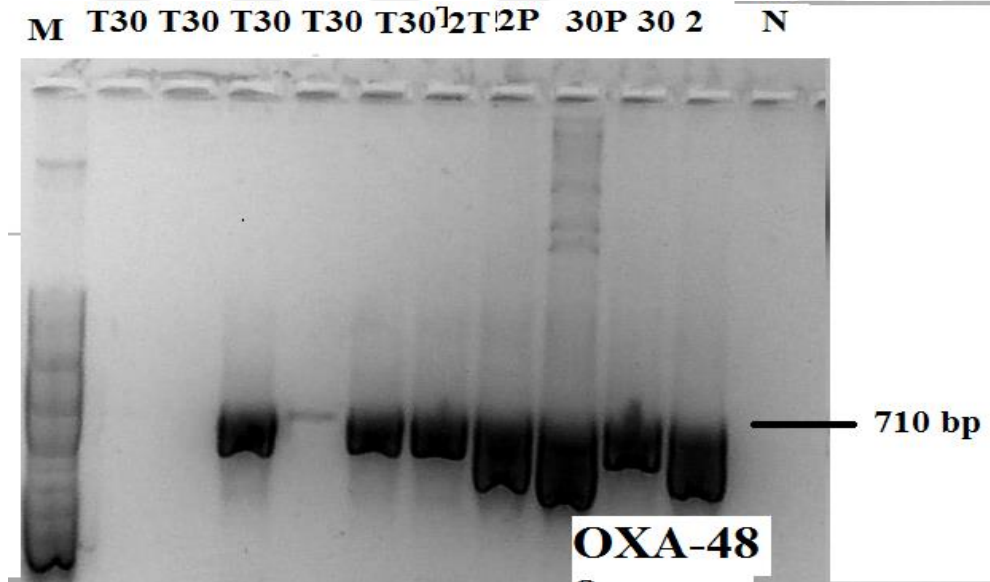
Şekil 19: PBRT yöntemi ile elde edilen amplifikasyon ürünlerinin bant görüntüleri.

A: Sütun 1: Hyper ladder II 50 bp marker(Bioline), Sütun 2: H1(471 bp),H2(327 bp) ve I1(142bp) replikonlarını içeren pozitif kontrol amplifikasyon ürünü (M1), Sütun 3-6: 2, 20, 24, 30 numaralı suşlara ait M1 karışımı ile hazırlanmış amplifikasyon ürünleri, Sütun 7: M (741 bp), N(514 bp), I2 (316 bp) ve B/O (159 bp) replikonlarını içeren pozitif kontrol amplifikasyon ürünü, Sütun 8-11: 2, 20, 24, 30 numaralı suşlara ait M2 karışımı ile hazırlanmış amplifikasyon ürünleri, Sütun 12: P(535 bp), F1C(260bp) replikonlarını içeren pozitif kontrol amplifikasyon karışımı, Sütun13-15: 2, 20, 24,30 numaralı suşlara ait M4 karışımı ile hazırlanmış amplifikasyon ürünleri.

B: Sütun 1:Marker, sütun 3:T(750 bp), A/C(417 bp),FIIS(259 bp) replikonlarını içeren pozitif kontrol amplifikasyon ürünü, Sütun 4,5:2 ve 20 numaralı suşa ait Inc A/C pozitifliği, Sütun 6: M6 karışımını içeren pozitif kontrol, Sütun 9,10,12: 2,20,30 numaralı suşlara ait Inc R ve Inc FIİK pozitifliği. Sütun 13: M7 karışımına ait Inc Y, Inc x2 ve Inn K'dan oluşan amplifikasyon ürünü. Sütun 14: 2 numaralı suşa ait amplifikasyon ürünü.

Plazmit transformasyon deneyleri sonuçları

İki ve 30 numaralı suşlara plazmit DNA ekstraksiyonu yapıldıktan sonra bu suşlara transformasyon deneyleri uygulandı. 30 numaralı suştan beş adet, 2 numaralı suştan bir adet transformant hücre elde edildi. Önce transformant hücreler, genomik DNA'lar, plazmit DNA'larına simpleks PZR yöntemi ile OXA-48 geni bakıldı. 30 numaralı suştan elde edilen transformant hücrelerin ikisinde ve 2 numaralı suştan elde edilen transformant hücrede OXA-48 geni saptandı. OXA-48 PZR görüntüleri şekil 20'de verilmiştir. Aynı örneklerde IncFIIK, IncR ve IncFIA plazmitleri simpleks PZR ve PBRT yöntemi ile tarandı. OXA-48 geni taşımayan 30 numaralı suşa ait iki transformant hücrede IncR tipi plazmit saptandı. OXA-48 geni taşıyan 30 numaralı suşa ait transformant hücrede herhangi bir replikon tespit edilemedi. 2 numaralı suşa ait transformant hücrenin OXA-48 geni taşıdığı ve aynı zamanda FIIK plazmitinin transformant hücreye aktarıldığı gözlemlendi. Dolayısıyla FIIK plazmitinin OXA-48 genin taşınmasında rol aldığı ortaya kondu. Fakat FIIK yanında OXA-48 geni aktarımında sorumlu olası ikinci bir plazmit tiplendirilemedi. Inc R tipi plazmitinin aktarıldığı hücrelerde OXA-48 geni tesbit edilmediği için IncR tipi plazmit beta-laktamaz genlerinin taşınmasından sorumlu tutuldu.



Şekil 20. Transformant hücrelere ait OXA-48 PZR görüntüleri.

(Sütun 1,2,4: 30 numaralı suşa ait beş adet transformant üçü OXA-48 negatif, sütun 3 ve5: 30 numaralı suşa ait OXA-48 pozitif Sütun 6: 2 numaralı suşa ait transformant hücre OXA-48 pozitif, Sütun 7, 8 genomik DNA'lar, Sütun 9, 10: plazmidik DNA'lar, Sütun 11: Negatif kontrol).

Tablo 16. *K. pneumoniae* (n=50) suşlarında bulunan direnç genleri, replikon tipleri ve PFGE profilleri.

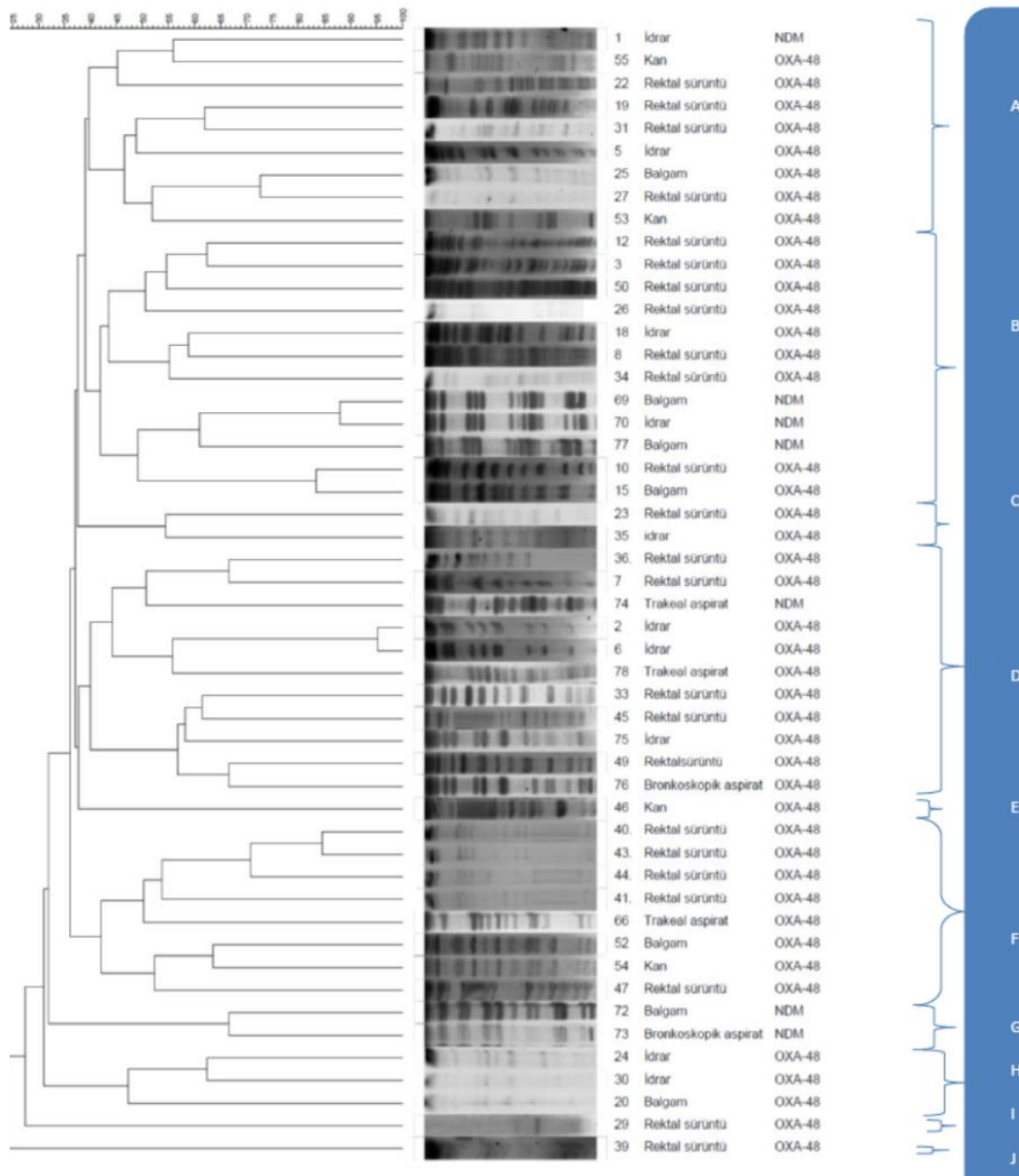
Suş no	Beta laktamaz	Karbapenemaz tipi	Replikon Tipi /Inc	PFGE Profili	Suş No	GSBL	Karbapenemaz	Replikon Tipi	PFGE Profi
1	CTX-M-15 TEM, SHV	NDM	R, H1b M, F1b, FII	A1	36	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C	D1
2	SHV	OXA-48	A/C, R, FIIK	D4	39	TEM, SHV	OXA-48	A/C	J
3	SHV	OXA-48	R	B2	40	SHV	OXA-48	B/O, R	F
5	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	-	A6	41	TEM, SHV	OXA-48	R	F4
6	SHV	OXA-48	A/C	D5	43	TEM, SHV	OXA-48	R,	F2
7	CTXM-1	OXA-48	A/C	D2	44	-	OXA-48	R, FIIK	F3
8	SHV	OXA-48	A/C	B6	45	TEM, SHV	OXA-48	R, FIIK	D8
10	TEM, SHV	OXA-48	A/C	B11	46	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	R, FIIK	E
12	TEM, SHV	OXA-48	A/C, R	B1	47	TEM, SHV	OXA-48	R, FIIK	F8
15	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	-	B12	49	TEM,SHV, CTXM-1	OXA-48	R,A/C	D10
18	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	-	B5	50	SHV	OXA-48	FIIK, A/C	B3
19	CTXM-1	OXA-48	A/C	A4	52	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	-	F6
20	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C, FIIK, R,F1A	H3	53	SHV	OXA-48	-	A9
22	SHV	OXA-48	-	A3	54	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	-	F7
23	SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C	C1	55	-	OXA-48	F1C	A2
24	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C, F1A	H1	66	TEM, SHV, CTXM-1, CTXM-2	OXA-48	-	F5
25	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C, R	A7	69	SHV, CTXM-1, CTXM-2	NDM	I1, R	B8
26	TEM, SHV	OXA-48	R	B4	70	-	NDM	R	B9
27	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C, R	A8	72	TEM, SHV, CTXM-1	NDM	R	G1
29	TEM,SHV	OXA-48	R, FIIK	I	73	-	NDM	-	G2
30	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	R, FIIK, F1A	H2	74	SHV	NDM	A/C	D3
31	TEM, SHV, CTXM-1	OXA-48	A/C,R,FIIK	A5	75	-	OXA-48	R	D9
33	TEM	OXA-48	A/C	D7	76	CTXM-1, CTXM-2	OXA-48	R	D11
34	TEM	OXA-48	A/C	B7	77	SHV, CTXM-1, CTXM-2	NDM	R	B10
35	TEM, CTXM-1	OXA-48	A/C	C2	78	SHV, CTXM-1, CTXM-2	OXA-48	-	D6

4.4. PFGE Sonuçları

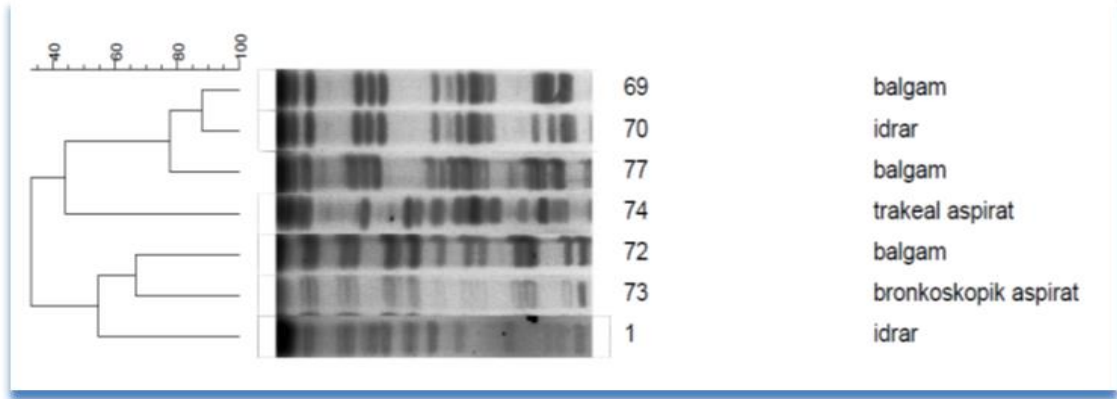
İzolatların PFGE sonuçlarına göre, 10 farklı küme ve 46 farklı genotipik grup saptandı. Baskın klon ya da salgın tesbit edilmedi. D kümesinde iki suş, F kümesindeki iki suş klonal olarak ilişkili bulundu.

İzolatların PFGE profilleri Şekil 21’de gösterilmiştir. A kümesinde 9 genotip (A1- A9), B kümesinde 12 genotip (B1- B12), C kümesinde 2 genotip (C1 ve C2), D kümesinde 11 genotip (D1-D11), E kümesinde bir (E1) F kümesinde 8 genotip (F1-F8), G kümesinde iki genotip (G1 -G2), H kümesinde üç genotip (H-H3), I ve J kümesinde birer genotip tespit edilmiştir. İzolatların PFGE profilleri, direnç genleri ve replikon tipleri Tablo 17’de verilmiştir. İzolatların PFGE profilleri şekil 21’de verilmiştir.

NDM geni taşıyan izolatlar kendi aralarında karşılaştırılmış, bu izolatlarda iki küme beş farklı genotip saptanmıştır. A kümesindeki 69 ve 70 (NDM pozitif) izolatlar klonal olarak ilişkili bulunmuş, A1 genotipi olarak tanımlanmıştır. 69 nolu A1 genotipindeki suş göğüs cerrahisi servisinden, 70 numaralı A1 genotipindeki suş ise iç hastalıkları acil servisinden izole edilmiştir. B kümesinde 72 ve 73 numaralı suşlar klonal olarak ilişkili bulunmuş, B1 genotipi olarak tanımlanmıştır. B1 olarak tanımlanan 72 numaralı suş genel cerrahi servisinden, 73 numaralı suş göğüs cerrahisi servisinden izole edilmiştir. NDM pozitif izolatların PFGE profilleri şekil 22’de gösterilmiştir.



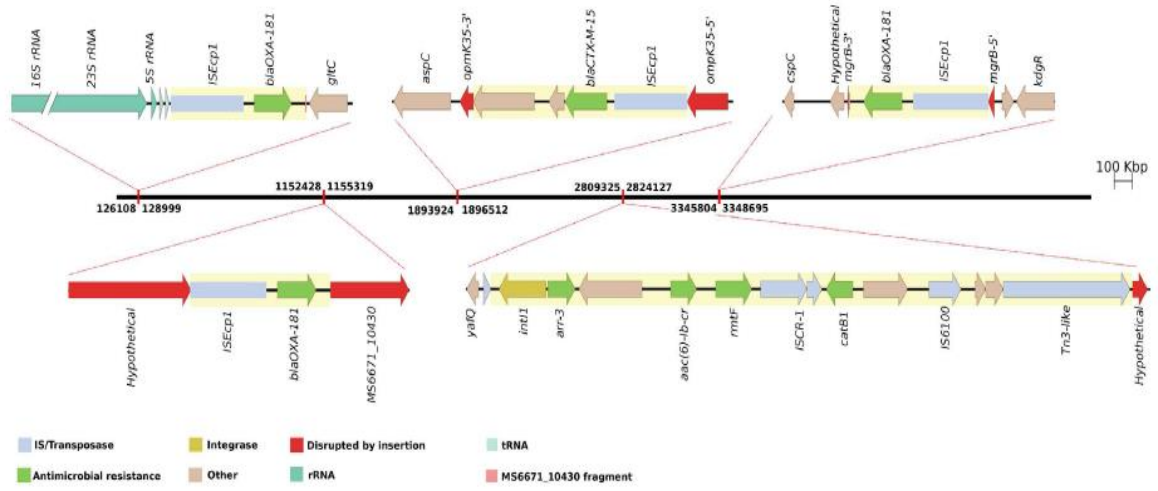
Şekil 21: *K. pneumoniae* suşlarının (n=50) PFGE sonuçları.



Şekil 22: NDM pozitif *K.pneumoniae* izolatlarının PFGE görüntüleri.

4.5. Tam Genom Analizi ve MLST Sonuçları.

Bir numaralı suşa yapılan tam genom dizi analizi sonucunda tam genomun 5,333,942 bp büyüklüğünde olduğu, ve blast programı ile veri tabanında karşılaştırıldığında *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286 ile %100 benzer olduğu belirlendi. Suşun kromozom üzerinde taşınan direnç genleri olarak; OXA-181, CTXM-15, arr-3, aac(6')-Ib-cr, rmtF, catB'i taşıdığı saptandı. Ayrıca yapılan tam plazmit analizi ile de NDM-1 tipi karbapenemaz genin plazmit üzerinde taşındığı anlaşıldı. ISEcp1 hareketli elementi üzerinde 3 kopya OXA-181 ve 1 kopya CTXM-15 bulunduğu gösterildi. OXA-181 ve CTXM-15 genlerinin ISEcp1 üzerindeki konumu şekil 23'de gösterilmiştir. I numaralı suşun MLST analizi sonucunda ST14 sekans tipine sahip olduğu bulunmuştur (Allel numaraları; gap A:1, inf B: 6, mdh:1, pgi:1, phoE:1, rpoB:1,tonB:1)



Şekil 23: 1 numaralı suşun blast analizi sonucu: Siyah çizgi : ISEcp1, OXA-181: 3 kopya, CTX-M-15: 1 kopya.

5. TARTIŞMA

Enterobacteriaceae ailesinde antibiyotik direnç gelişimi tüm dünyayı ilgilendiren önemli bir halk sağlığı sorunudur. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazları (GSBL) sentezleyen enterik bakterilerin yanı sıra, son yıllarda karbapenemaz enzimlerini de üreten enterik bakteriler, dünyada değişik bölgelerde salgınlara neden olmakta ve giderek artan oranda sporadik vakalar rapor edilmektedir. Genellikle GSBL üretimi ve porin proteinlerinin kaybıyla birlikte dirence neden olan moleküler sınıf B (IMP, VIM ve NDM), sınıf A (KPC) ve sınıf D (OXA-23 and OXA-48) karbanemazlar *Enterobacteriaceae* ailesinde antibiyotik direnç gelişimi için önemli bir problemdir. Bu direnç genleri genelde plazmit, transpozon ve IS elementleri gibi hareketli elementler üzerinde taşınmakta ve bu genleri taşımayan diğer bakterilere aktarabilme özelliklerinden dolayı epidemiyolojik olarak yayılım özelliği göstermektedirler. Plazmit ve antibiyotik direnç ilişkisi çeşitli çalışmalarda ayrıntılı olarak gösterilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinde major plazmit ailelerinin (HI2, HI1, I1-γ, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A/C, T, K, B/O) replikonlarını hedef alan PZR Temelli Replikon Tiplendirme (PBRT) yöntemi 2005 yılından bu yana kullanılmaktadır.

Çalışmamızda 1500 yataklı İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi'nde yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae* klinik izolatlarında karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzim tiplerinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi, intrinsik plazmit replikaz genlerinin dağılımı ve bu plazmitlerin ülkemizde endemik olarak görülen OXA-48 karbapenemaz enzimi üretiminden sorumlu olan genlerle ilişkilerinin belirlenmesi, son dönemde ortaya çıkan yeni karbapenemaz enzimlerinin varlığı ve sıklığı konusunda güncel durumun değerlendirilmesi ve suşların klonal ilişkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Antibiyotik duyarlılık sonuçları CLSI önerilerine göre değerlendirildiğinde, suşların hepsi sefazolin, sefuroksim, amoksisilin/klavulonik asit, ampicilin/sulbaktam, piperasilin/ tazobaktam dirençli bulundu. Sefotaksim ve seftazidim direnci %90, sefoksitin direnci %80 , sefepim direnci %70 amikasin direnci %20, tobramisin direnci %60, gentamisin direnci %52, siprofloksasin direnci %50, trimetoprim sulfometaksazol direnci %78 ve aztroneam direnci %76 olarak bulundu. OXA-48 pozitif izolatların %72'si aztroenama dirençli bulunurken, NDM pozitif izolatların tümü aztroneama

dirençli bulundu. Metallo beta laktamaz enzimleri aztreonamı hidrolize etmemesine rağmen NDM pozitif suşların aztreonama dirençli bulunması bu suşlarda farklı direnç mekanizmalarının varlığının, karbapenemaz direncine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (105). Genel olarak OXA-48 enzimleri beta laktamaz inhibitörlerine dirençlidir, çalışmamız sonuçlarına göre bütün izolatlar amoksisilin/klavulonik asit, ampisilin/sulbaktam ve piperasilin/tazobaktam dirençli bulunmuştur, bu durum beklenen bir sonuçtur. Ancak OXA-48 enzimini üreten suşlar aztreonam da dahil seftazidim ve seftaksim zayıf bir şekilde hidrolize ederler. Bizim sonuçlarımızda seftazidim ve seftaksim için direnç oranı %90, aztreonam için %76 bulunmuştur. Bu yüksek direnç oranları bu bakterilerde bulunan ve beta laktam antibiyotik direnci ile ilişkili olan özellikle CTX-M tipi enzimlerden kaynaklanmaktadır. Nitekim OXA-48 veya NDM pozitif suşların %42'sinde CTXM -1 ve SHV, %56'sında TEM ve SHV, %38'inde CTXM-1 ve SHV, %36'sında TEM, SHV ve CTXM-1 tipi beta laktamaz birlikteliği saptanmıştır. Bunların dışında 66, 69, 76, 77 ve 78 no'lu suşların, NDM veya OXA-48 genleriyle birlikte SHV, CTX-M-1 grup ve CTX-M-2 grubunu taşıdığını gözlemlediğimiz hibrit suşlardır. Bu suşlar PFGE tiplendirmesine göre klonal ilişkili de bulunmamıştır ve genelde R plazmitlerini taşımaktadırlar.

Mikrodilüsyon yöntemi ile suşların %92'si ertapeneme dirençli, %8'i orta duyarlı; %68'i meropeneme dirençli, %10'u orta duyarlı bulunmuştur. İmipenem direnci %90, doripenem direnci %74 olarak belirlenmiştir. Karbapenemler arasında en yüksek direnç oranı ertapenemde gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre en etkili karbapenem meropenem>doripenem>imipenem>ertapenem olarak gözlenmiştir. Mikrodilüsyon yöntemi ile karbapenem direncini yakalama duyarlılığı; ertapenemin %92,5, imipenemin %79,3, meropenemin ise %75,7 bulunmuştur. Bu durum ertapenemin karbapenemaz üretimini tespit etmede oldukça duyarlı olduğunu desteklemekle birlikte, yapılan çalışmalar genişlemiş spektrumlu ve Amp C tipi beta laktamazlara duyarlı olması ve porin kaybından daha fazla etkilenmesi sebebiyle yanlış pozitifliklere rağmen, ertapenemin karbapenemaz tespitinde yüksek duyarlılığa sahip olduğunu ve rutin taramalarda panelde mutlaka bulunması gerekliliğini desteklemektedir (106). OXA-48 pozitif izolatlarda ertapenem, imipenem, doripenem ve meropenem için direnç oranları sırasıyla %95,3, %93, %74,4 ve %62,8 bulunmuştur. NDM pozitif izolatlarda ise ertapenem, meropenem, imipenem, doripenem direnç oranları sırasıyla %100, %85, %28,6 ve %57,1 bulunmuştur. OXA-48 pozitif izolatlarda direnç

sıralaması ertapenem> imipenem>doripenem>meropenem şeklinde, NDM pozitif izolatlarda direnç sıralaması ertapenem> meropenem> doripenem> imipenem olarak bulunmuştur. OXA-48 pozitif ve NDM pozitif izolatların karbapenem duyarlılıkları tablo 15’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir.

Suşların karbapenemler için MİK değerleri sonuçları ile disk difüzyon yöntemi sonuçları karşılaştırıldığında, disk difüzyon ile direnç %100 oranında saptanırken, dört suş mikrodilüsyon yöntemi orta duyarlı bulunmuş ve direnç oranı %92’ye düşmüştür. Meropenem için ise disk difüzyon ile direnç %82 olarak saptanırken, mikrodilüsyon ile %68 olarak saptanmıştır. İmipenem için disk difüzyon ile direnç %76, mikrodilüsyon ile %74 olarak bulunmuştur. Bu durum suşlar disk difüzyon yöntemi ile tarandığında dirençli suşların gözden kaçma olasılığının düşük olduğunu ve taramanın disk difüzyon yöntemi ile yapılabileceğini göstermektedir. Disk difüzyon ve mikrodilüsyon yöntemlerine göre suşların duyarlılıklarının karşılaştırılması tablo 13’de verilmiştir. CLSI klinik sınır değerleri baz alınarak yapılan disk difüzyon yöntemi sonuçlarına göre ertapenem direnci %100, meropenem direnci %84,7 ve imipenem direnci %80,6 bulunmuştur. Florian ve arkadaşları 142’si karbapenemaz üreten 334 *Enterobacter* spp. suşu ile yaptıkları çalışmada ertapenem, meropenem, imipenem duyarlılıklarını disk difüzyon yöntemi ile taramışlar, CLSI ve EUCAST verilerine göre ayrı ayrı değerlendirilmişlerdir. CLSI verilerine göre yaptıkları değerlendirmede ertapenem ve meropenemin duyarlılıklarını %95,5, imipenemin duyarlılığını ise % 90,9 bulmuşlardır (107).

Bu çalışmada suşların karbapenemaz aktivitesini saptamak için fenotipik test olarak uygulanan modifiye hodge testi (MHT) uygulanmış ve tüm suşlar pozitif olarak saptanmış ve testin duyarlılığı %100 olarak bulunmuştur. Modifiye hodge test CLSI tarafından önerilen, ucuz ve pratik bir test olmasına rağmen, yapılan çalışmalarda Amp C üretimi, azalmış geçirgenlik ya da porin kaybı gibi nedenlerle yanlış pozitif sonuçların olabileceğini ve testin özgüllüğünün düşük olduğunu ortaya koymuştur (108). MHT’nin diğer bir dezavantajı karbapenemaz tipini belirleyememesidir. Pasteran ve arkadaşları KPC tipi karbapenemazın ayırımını sağlayabilen oksasiline MHT’ni geliştirmişlerdir, testin duyarlılığını %92, özgüllüğünü %100 olarak bildirmişlerdir (109).

Çalışmamızda karbapenemaz tanısına yönelik ikinci bir fenotipik test olarak, boronik asit çift disk sinerji testi: ertapenem ve imipenem antibiyotikleri kullanılarak

uygulanmıştır (400µg FBA). OXA-48 pozitif izolatlarda, ertapenemli boronik asit testinde duyarlılık %56,5, imipenemli boronik asit tetinde duyarlılık %52 olarak bulunmuştur. NDM pozitif izolatlarda ertapenem ve imipenemli boronik asit testlerinin her ikisinde de duyarlılık %63,6 bulunmuştur. Elsherif ve arkadaşları *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerini içeren 45 klinik izolata ; meropenem (300 µg FBA ve 600 µg FBA) ve imipenem (300 µg FBA ve 600µg FBA) kullanarak boronik asit disk testi uygulamışlardır. OXA-48 pozitif izolatlarda en yüksek duyarlılığı meropenem ve 600µg FBA boronik asit disk testinde %83,33 olarak bildirmişlerdir. NDM pozitif izolatlarda ise testin duyarlılığını %87,5 olarak bildirilmiştir (110).

Çalışmamızda PCR yöntemiyle 50 *K. pneumoniae* izolatının %86 (n=43)'sında OXA-48 geni, %14 (n=7)'ünde ise NDM geni tespit edildi. Ülkemizde ve dünyada OXA-48 karbapenemaz geni taşıyan *K. pneumoniae* ilk kez 2003 yılında tek bir suştan ve hastanemizden bildirilmiştir Geçen 13 sene boyunca, günümüzde yurdumuzda yeterli infeksiyon önlemlerinin alınmamasına bağlı olarak hastanelerde yerleşmiş ve endemik hale geçmiştir. OXA-48 genini taşıyan *K. pneumoniae* suşları ile salgın yine hastanemizde meydana gelmiş ve Carrer ve arkadaşları tarafından 2008 yılında bildirilmiştir (73, 111, 112). Çalışmamızda OXA-48 pozitif izolatların çoğunlukla genişlemiş spektrumlu beta laktamazlarla bir birlikte olduğu ve üçüncü kuşak sefalosporinler dahil tüm beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının %50'nin üzerinde olduğu görülmüştür. OXA-48 tipi karbapenemaz taşıyan suşların aminoglikozitler sınıfından amikasinine %74,4 oranında duyarlı bulunması, amikasinin tedavi seçeneği olabileceği düşüncesine neden olmaktadır. Ancak yapılan çalışmalarda, amikasinin böbreklere toksik etkisinin olması dolayısıyla doz kısıtlamasının yapılması nedeniyle, amikasinin karbapenemaz üreten suşlar için tek başına iyi bir tedavi seçeneği olmadığını ortaya koymaktadır (113). Çalışmamızda OXA-48 pozitif izolatların %83,7'si tigesikline, %91'i kolistine duyarlı bulunmuştur. Bu durum kolistin ve tigesiklini alternatif tedavi seçeneği olarak düşündürürken, kolistine dirençli bulunan izolatların hepsinin 11.11.2015 tarihinden sonra izole edilmiş olması, kolistin direncinin son bir senede hastanemizde ortaya çıktığını ve bu izolatlarda kombinasyon tedavisi dışında tedavi seçeneğinin kalmadığını ortaya koymaktadır (49).

Türkiye’de ve dünyada yapılan çalışmalarda OXA-48 tipi karbapenemazın çoğunlukla IncL/M tipi plazmit üzerinde taşındığı bildirilmektedir (114). Moleküler epidemiyolojik çalışmalarda NDM tipi karbapenemazın horizontal yayılımından sıklıkla IncA/C tipi plazmitin sorumlu olduğu ve NDM tipi karbapenemazın yayılımından sorumlu tutulan diğer plazmit tiplerinin IncFIIK, IncL/M, IncH1 olduğu bildirilmiştir (115). Çalışmamızda PZR temelli plazmit replikon tiplendirmesi ile suşların plazmit tipleri taranmış ancak IncL/M tipinde replikona rastlanmamıştır. OXA-48 tip karbapenemaz taşıyan suşların %46,5’inde IncR tipi, %46,5’inde IncA/C tipi, %20,9’unda Inc FIIK replikonlar saptanmıştır. PFGE profilleri farklı olan iki suşa transformasyon deneyi uygulanmış ve OXA-48 geninin FIIK plazmiti ile aktarıldığı gösterilmiştir. Çalışmamızda yedi NDM pozitif izolatın %71,4’ünde IncR , %14,3’ünde ise IncA/C tipinde replikon saptanmıştır.

IncI1 tip plazmit 2016 yılında ESBL pozitif *E. coli* suşlarında bildirilmiştir ve CTXM-8 aktarımından sorumlu olduğu southern blot hibridizasyon yöntemi ile gösterilmiştir (116). IncI1 tipi plazmit bu çalışmada CTXM-1, CTXM-2, TEM, SHV ve NDM direnç genlerini aynı anda taşıyan *K. pneumoniae* izolatında (KP 66) saptanmıştır.

Türkiye’de OXA-48 tipi karbapenemazlarla ilk salgın 2008 yılında iki farklı klon ile İstanbul Tıp Fakültesi’nden bildirilmiştir(111). Güncel çalışmalar ve bizim çalışmamızda PFGE profilleri ile elde edilen dendogramlarda farklı klonal grupların bulunması direncin klonlar arasında hareketli elemanlar (transpozonlar, plazmitler) ile hızla yayıldığını göstermektedir (117).

Türkiye’de NDM tipi karbapenemaz artan oranda bildirilmektedir. Hacıseyitoğlu ve arkadaşları karbapeneme dirençli *E. cloacae* ve *K. pneumoniae* suşlarıyla yaptıkları çalışmada sekiz NDM pozitif izolatı klonal olarak ilişkili bulmuşlardır (118). Karbapeneme dirençli 14 *Enterobacter cloacae* suşu ile yapılan bir diğer çalışmada; PFGE sonuçlarına göre 8 NDM-1 pozitif izolatın aynı klondan olduğu bildirilmiştir. (51). Çalışmamızda yedi NDM-1 pozitif izolatın PFGE profillerini karşılaştırdığımızda 5 farklı genotip bulunduğunu görmekteyiz. Bu durumun hastanemizin sağlık turizmine oldukça açık olmasının yanında NDM-1 geninin aradaki zaman diliminde plazmit ile farklı klonlara taşınmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (119).

Çok ilaca dirençli *K. pneumoniae* suşlarının dünya çapında yayılımı önemli bir toplum sağlığı sorunudur. ST11, ST14, ST147, ST340, ST149, ST231 NDM ile ilişkilendirilmiş *K. pneumoniae* sekans tipleridir. ST11 NDM yanında KPC ve OXA-48 ile de ilişkilendirilen yüksek riskli sekans tipidir (63). Bu çalışmada MLST analizi sonucu NDM tipi karbapenemaz taşıyan bir numaralı suşun sekans tipi ST14 olarak bulunmuştur. ST 14 sekans tipi ilk defa İsviçre’de Hindistanlı bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* 05-506 suşunda bildirilmiştir (54). CaPES çalışma grubu biri Hindistan diğeri Tayland kaynaklı olan toplamda üç NDM tipi karbapenemaz taşıyan *K. pneumoniae*’nın ST14 sekans tipinde olduklarını bildirmişlerdir (120). Hastanelerin direnç profillerini belirlemesi, dirençli suşların sekans tiplerini belirlemesi; uygun enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve direnç yayılımını önleyecek yeni çözümlerin geliştirilmesi direncin yayılımının önlenmesi açısından son derece önemlidir. Ülkede güncel durumun belirlenmesi için bütün ülkeyi kapsayacak çok merkezli çalışmalara ihtiyaç vardır.

Son yıllarda *K. pneumoniae* suşlarında artan oranda kolistin direnci de bildirilmektedir (121). Çalışmamızda kolistin dirençli NDM tipi karbapenemaz taşıyan bir izolata tam genom dizi analizi uygulanmıştır. Dizi analizi sonucunda direnç genleri olarak aynı insersiyon sekans elementi üzerinde OXA-181, CTXM-15, arr-3, aac(6’)-Ib-cr, rmtF, catB1 taşıdığı tespit edilmiştir. OXA-181 tipi sınıf D karbapenemaz OXA-48 enziminin yapısına bir aminoasit eklenmesiyle oluşan türevidir ve ilk defa 2011 yılında Potron ve arkadaşları tarafından Hindistan’dan bildirilmiştir (70). Ardından hızla diğer dünya ülkelerinden de bildirimler olmuştur. OXA-181 tipi karbapenemaz Türkiye’den ilk kez bu çalışma ile bildirilmektedir. OXA 181, yapılan tam genom dizi analizi çalışmalarında kolistin direnci ile de ilişkilendirilmiştir (74). arr-3, aac(6’)-Ib-cr, rmtF genleri aminoglikozit direncinden, cat geni ise kloramfenikol direncinden sorumludur(122). Daha önceki çalışmalarda NDM-1 geninin sıklıkla CTXM-15 ve rmt genleriyle birlikte olduğu, NDM-1 ve rmtc genlerinin aynı plazmit üzerinde, CTXM-15’in ise farklı bir plazmit ile aktarıldığı gösterilmiştir (51). OXA-181 taşıyan *K. pneumoniae* suşlarında tam genom dizi analizi çalışmalarının artırılması OXA-181 enziminin kolistin direnci ile ilişkisini açığa kavuşturacaktır (74).

Bu çalışma sonuçlarına göre, hastanemizde karbapenem direncinden sorumlu olan en yaygın enzim tipinin OXA-48 karbapenemaz olduğu tespit edildi, daha önceki

yıllarda hastanemizde gözlenmemiş olan NDM-1 tipi karbapenemaz enzimini taşıyan suş oranında artış olduğu gözlemlendi. OXA-48 ve NDM-1 tipi karbapenemazların plazmit üzerinde taşındığı transformasyon ve tam genom analizi çalışmaları ile gösterildi. Bu çalışmada *K. pneumoniae* suşuna tam genom dizi analizi uygulanmış ve bu suшта kolistin direncine de neden olan ve OXA-181 tipi karbapenemaz enziminin varlığı Türkiye’den ilk defa bildirilmiştir.

Çalışmamızın epidemiyolojik verilere katkı sağlaması, direnç ve tedavi ilişkisinin kurularak ekonomik kayıpların önlenmesi, hastanede yatış süresinin, mortalite ve morbiditenin azaltılması ile ilgili tedbirlerin alınması noktasında önemli bir yol gösterici olacağı ve uzun dönemde çok merkezli moleküler epidemiyoloji çalışmalarının düzenli ve sürekli olarak yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

KAYNAKLAR

1. Brisse S, Passet V, Grimont PA. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. International journal of systematic and evolutionary microbiology. 2014;64(Pt 9):3146-52.
2. Hsueh PR, Wu JJ, Teng LJ, Chen YC, Yang PC, Ho SW, et al. Primary liver abscess caused by one clone of *Klebsiella pneumoniae* with two colonial morphotypes and resistotypes. Emerging infectious diseases. 2002;8(1):100-2.
3. Shin SU, Park CM, Lee Y, Kim EC, Kim SJ, Goo JM. Clinical and radiological features of invasive *Klebsiella pneumoniae* liver abscess syndrome. Acta radiologica. 2013;54(5):557-63.
4. Rashid T, Wilson C, Ebringer A. The link between ankylosing spondylitis, Crohn's disease, *Klebsiella*, and starch consumption. Clinical & developmental immunology. 2013;2013:872632.
5. <http://www.who.int/drugresistance/activities/>.
6. Hsueh PR. New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among Enterobacteriaceae. J Formos Med Assoc. 2010;109(10):685-7.
7. Zhanel GG, Adam HJ, Baxter MR, Fuller J, Nichol KA, Denisuik AJ, et al. Antimicrobial susceptibility of 22746 pathogens from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007-11 study. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2013;68 Suppl 1:i7-22.
8. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. Journal of Clinical Microbiology. 1995;33(9):2233-9.
9. .(<http://www.mlst.net/> hwpf.
10. Andersson P, Tong SYC, Bell JM, Turnidge JD, Giffard PM. Minim Typing – A Rapid and Low Cost MLST Based Typing Tool for *Klebsiella pneumoniae*. PLoS ONE. 2012;7(3):e33530.
11. Wu F, Della-Latta P. Hospital-acquired Infections in the Neonatal Intensive Care Unit Molecular typing strategies. Seminars in Perinatology. 2002;26(5):357-66.
12. Power EGM. RAPD typing in microbiology—a technical review. Journal of Hospital Infection. 1996;34(4):247-65.
13. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. International journal of medical microbiology : IJMM. 2013;303(6-7):298-304.
14. Watanabe T, Fukasawa T. Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. Journal of bacteriology. 1961;81:669-78.
15. Ramirez MS, Traglia GM, Lin DL, Tran T, Tolmasky ME. Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance and Virulence in Gram-Negatives: the *Klebsiella pneumoniae* Paradigm. Microbiology spectrum. 2014;2(5).
16. Eguchi Y, Tomizawa J-i. Complexes formed by complementary RNA stem-loops. Journal of Molecular Biology. 1991;220(4):831-42.
17. Cao V, Lambert T, Courvalin P. ColE1-Like Plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-17. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(5):1212-7.
18. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, Actis LA, Tolmasky ME. Complete Nucleotide Sequence of *Klebsiella pneumoniae* Multiresistance Plasmid pJHCMW1. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2002;46(11):3422-7.

19. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(5):1998-2004.
20. Garcia-Fernandez A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(4):2143-5.
21. Dolejska M, Brhelova E, Dobiasova H, Krivdova J, Jurankova J, Sevcikova A, et al. Dissemination of IncFII(K)-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. *International journal of antimicrobial agents*. 2012;40(6):510-5.
22. Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de La Cruz F. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews*. 2009;33(3):657-87.
23. Datta N, Hedges RW. Compatibility groups among ϕ - R factors. *Nature*. 1971;234(5326):222-3.
24. Datta N, Hughes VM. Plasmids of the same Inc groups in *Enterobacteria* before and after the medical use of antibiotics. *Nature*. 1983;306(5943):616-7.
25. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:242.
26. Smalla K, Jechalke S, Top EM. Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. *Microbiology spectrum*. 2015;3(1):PLAS-0038-2014.
27. <http://pubmlst.org/plasmid/>.
28. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*. 2005;63(3):219-28.
29. Bertini A, Poirel L, Mugnier PD, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Characterization and PCR-based replicon typing of resistance plasmids in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(10):4168-77.
30. Villa L, Garcia-Fernandez A, Fortini D, Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65(12):2518-29.
31. Lee CR, Cho IH, Jeong BC, Lee SH. Strategies to minimize antibiotic resistance. *International journal of environmental research and public health*. 2013;10(9):4274-305.
32. Kontopidou F, Giamarellou H, Katerelos P, Maragos A, Kioumis I, Trika-Graphakos E, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece: a multi-centre study on clinical outcome and therapeutic options. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(2):O117-23.
33. Tangden T, Giske CG. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *Journal of internal medicine*. 2015;277(5):501-12.
34. Jiao Y, Qin Y, Liu J, Li Q, Dong Y, Shang Y, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. *Pathogens and global health*. 2015;109(2):68-74.
35. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 1980;289(1036):321-31.
36. Sutter R, Ruegg S, Tschudin-Sutter S. Seizures as adverse events of antibiotic drugs: A systematic review. *Neurology*. 2015;85(15):1332-41.
37. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63(4):659-67.

38. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2001;45(4):1151-61.
39. Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62 Suppl 2:ii55-63.
40. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008;62(6):1261-4.
41. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-beta-lactamases: a last frontier for beta-lactams? *The Lancet Infectious diseases*. 2011;11(5):381-93.
42. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014;20(9):821-30.
43. Tseng IL, Liu YM, Wang SJ, Yeh HY, Hsieh CL, Lu HL, et al. Emergence of Carbapenemase Producing *Klebsiella Pneumonia* and Spread of KPC-2 and KPC-17 in Taiwan: A Nationwide Study from 2011 to 2013. *PLoS One*. 2015;10(9):e0138471.
44. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(10):5873-84.
45. Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(10):4333-8.
46. Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(2):796-7.
47. Daikos GL, Tsaousi S, Tzouveleakis LS, Anyfantis I, Psychogiou M, Argyropoulou A, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(4):2322-8.
48. Stoesser N, Mathers AJ, Moore CE, Day NP, Crook DW. Colistin resistance gene mcr-1 and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(3):285-6.
49. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious diseases*. 2016;16(2):161-8.
50. Giske CG. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2015;21(10):899-905.
51. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(5):2929-33.
52. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1995;39(4):824-9.

53. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12(7):695-6.
54. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;53(12):5046-54.
55. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo-beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerging infectious diseases*. 2011;17(1):103-6.
56. Oteo J, Ortega A, Bartolome R, Bou G, Conejo C, Fernandez-Martinez M, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high *in vitro* susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(6):3406-12.
57. Voulgari E, Gartzonika C, Vroni G, Politi L, Priavali E, Levidiotou-Stefanou S, et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(8):2091-7.
58. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerging infectious diseases*. 2013;19(6):870-8.
59. Kazi M, Drego L, Nikam C, Ajbani K, Soman R, Shetty A, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a tertiary care laboratory in Mumbai. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2015;34(3):467-72.
60. Dash N, Panigrahi D, Zarouni MA, Darwish D, Ghazawi A, Sonnevend A, et al. High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*. 2014;20(1):52-6.
61. Ling ML, Tee YM, Tan SG, Amin IM, How KB, Tan KY, et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. *Antimicrobial resistance and infection control*. 2015;4:26.
62. Partridge SR, Iredell JR. Genetic contexts of blaNDM-1. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(11):6065-7; author reply 71.
63. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;57(1):130-6.
64. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in molecular medicine*. 2012;18(5):263-72.
65. Tangden T, Hickman RA, Forsberg P, Lagerback P, Giske CG, Cars O. Evaluation of double- and triple-antibiotic combinations for VIM- and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* by *in vitro* time-kill experiments. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1757-62.
66. Bercot B, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. *In vitro* evaluation of antibiotic synergy for NDM-1-producing Enterobacteriaceae. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2011;66(10):2295-7.
67. Wang X, Zhang F, Zhao C, Wang Z, Nichols WW, Testa R, et al. *In vitro* activities of ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam against 372 Gram-negative bacilli collected in 2011 and 2012 from 11 teaching hospitals in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(3):1774-8.

68. Budak S, Aktas Z, Oncul O, Acar A, Ozyurt M, Turhan V, et al. Detection of OXA-51 Carbapenemase Gene in *Klebsiella pneumoniae*: A Case Report and a New Dimension on Carbapenemase Resistance. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*. 2013;07(02).
69. Aktaş Z, Kayacan ÇB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*. 2008;54(2):101-6.
70. Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(10):4896-9.
71. Potron A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. Characterisation of OXA-244, a chromosomally-encoded OXA-48-like beta-lactamase from *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*. 2016;47(1):102-3.
72. Hou XH, Song XY, Ma XB, Zhang SY, Zhang JQ. Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Brazilian journal of microbiology* : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]. 2015;46(3):759-68.
73. Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(1):15-22.
74. Zowawi HM, Forde BM, Alfaresi M, Alzarouni A, Farahat Y, Chong TM, et al. Stepwise evolution of pandrug-resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific reports*. 2015;5:15082.
75. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2013;18(31).
76. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55(6):2546-51.
77. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, Fleites A, Saez D, Bautista V, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(2):317-21.
78. Evren E, Azap OK, Colakoglu S, Arslan H. *In vitro* activity of fosfomycin in combination with imipenem, meropenem, colistin and tigecycline against OXA 48-positive *Klebsiella pneumoniae* strains. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2013;76(3):335-8.
79. Mammeri H, Guillon H, Eb F, Nordmann P. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2010;54(11):4556-60.
80. Anandan S, Damodaran S, Gopi R, Bakthavatchalam YD, Veeraraghavan B. Rapid Screening for Carbapenem Resistant Organisms: Current Results and Future Approaches. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2015;9(9):DM01-3.
81. Carvalhaes CG, Cayo R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, Okamoto D, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2014;69(8):2132-6.
82. Nakano R, Nakano A, Ishii Y, Ubagai T, Kikuchi-Ueda T, Kikuchi H, et al. Rapid detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) gene by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2015;21(3):202-6.
83. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(9):1503-7.

84. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281-3.
85. CLSI CaLSIMSpfast. June 2010 update. .
86. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.* 2001;7(2):88-91.
87. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol.* 2008;46(12):4083-6.
88. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology.* 2009;47(2):362-7.
89. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J. Phenotypic detection of metallo-beta-lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *TheScientificWorldJournal.* 2012;2012:654939.
90. Turton JF, Woodford N, Glover J, Yarde S, Kaufmann ME, Pitt TL. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the blaOXA-51-like carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol.* 2006;44(8):2974-6.
91. Kusradze I, Diene SM, Goderdzishvili M, Rolain JM. Molecular detection of OXA carbapenemase genes in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Iraq and Georgia. *International journal of antimicrobial agents.* 2011;38(2):164-8.
92. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2009;53(1):333-4.
93. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2007;59(2):321-2.
94. AKTAŞ Z, GÖNÜLLÜ N, Kayacan ZÇ, Özdem A, Carattoli A, Yong DE, et al. CTX-M-15 Carried On Incn-Type Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Türkiye Klinikleri Journal of Medical Sciences.* 2009;29(6):1355.
95. Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2005;57(1):154-5.
96. Newire EA, Ahmed SF, House B, Valiente E, Pimentel G. Detection of new SHV-12, SHV-5 and SHV-2a variants of extended spectrum Beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Egypt. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials.* 2013;12(1):1-12.
97. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol.* 2002;40(6):2153-62.
98. Garcia-Fernandez A, Fortini D, Veldman K, Mevius D, Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy.* 2009;63(2):274-81.
99. Harada K, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Sato T, Usui M, et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Klebsiella* spp. Isolates from Companion Animals in Japan: Clonal Dissemination of Multidrug-Resistant Extended-Spectrum beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in microbiology.* 2016;7:1021.
100. Wang Q, Li B, Tsang AK, Yi Y, Woo PC, Liu CH. Genotypic Analysis of *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Beijing Hospital Reveals High Genetic Diversity and Clonal Population Structure of Drug-Resistant Isolates. *PloS one.* 2013;8(2):e57091.

101. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95.
102. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):4178-82.
103. Netikul T, Kiratisin P. Genetic Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae and the Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumonia* ST340 at a University Hospital in Thailand. *PLoS One*. 2015;10(9):e0139116.
104. <CLSI_M100-S24.pdf>. 1Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement
105. Zmarlicka MT, Nailor MD, Nicolau DP. Impact of the New Delhi metallo-beta-lactamase on beta-lactam antibiotics. *Infection and drug resistance*. 2015;8:297-309.
106. Vading M, Samuelsen O, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2011;17(5):668-74.
107. Maurer FP, Castelberg C, Quiblier C, Bloemberg GV, Hombach M. Evaluation of carbapenemase screening and confirmation tests with Enterobacteriaceae and development of a practical diagnostic algorithm. *J Clin Microbiol*. 2015;53(1):95-104.
108. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2011;49(5):1965-9.
109. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol*. 2010;48(4):1323-32.
110. Elsherif R, Ismail D, Elawady S, Jastaniah S, Al-Masaudi S, Harakeh S, et al. Boronic acid disk diffusion for the phenotypic detection of polymerase chain reaction-confirmed, carbapenem-resistant, gram-negative bacilli isolates. *BMC Microbiol*. 2016;16(1):135.
111. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2008;52(8):2950-4.
112. Zarakolu P, Eser OK, Aladag E, Al-Zahrani IA, Day KM, Atmaca O, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2016;85(4):466-70.
113. Brasseur A, Hites M, Roisin S, Cotton F, Vincent JL, De Backer D, et al. A high-dose aminoglycoside regimen combined with renal replacement therapy for the treatment of MDR pathogens: a proof-of-concept study. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(5):1386-94.
114. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(1):559-62.
115. Bonnin RA, Poirel L, Carattoli A, Nordmann P. Characterization of an IncFII plasmid encoding NDM-1 from *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*. 2012;7(4):e34752.
116. Ferreira JC, Penha Filho RAC, Andrade LN, Berchieri Junior A, Darini ALC. Evaluation and characterization of plasmids carrying CTX-M genes in a non-clonal population of

multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from poultry in Brazil. Diagnostic microbiology and infectious disease. 2016;85(4):444-8.

117. Azap Ö, Otlu B, Yeşilkaya A, Yakupoğulları Y. Detection of OXA-48-like Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology. Balkan medical journal. 2013;30(2):259-60.

118. Haciseyitoğlu D, Dokutan A, Abulaila A, Erdem F, Cağ Y, Ozer S, et al. The first *Enterobacter Cloacae* co-producing NDM and OXA-48 carbapenemases and interhospital spread of OXA-48 and NDM producing *Klebsiella pneumoniae*. 5th International Conference on Advances in Computing & Communications 2015. 2015.

119. Wailan AM, Paterson DL, Kennedy K, Ingram PR, Bursle E, Sidjabat HE. Genomic Characteristics of NDM-Producing Enterobacteriaceae Isolates in Australia and Their blaNDM Genetic Contexts. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2016;60(1):136-41.

120. Khong WX, Marimuthu K, Teo J, Ding Y, Xia E, Lee JJ, et al. Tracking inter-institutional spread of NDM and identification of a novel NDM-positive plasmid, pSg1-NDM, using next-generation sequencing approaches. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2016.

121. Kieffer N, Poirel L, Nordmann P, Madec JY, Haenni M. Emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from veterinary medicine. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2015;70(4):1265-7.

122. Gabant P, Newnham P, Taylor D, Couturier M. Isolation and location on the R27 map of two replicons and an incompatibility determinant specific for IncHI1 plasmids. Journal of bacteriology. 1993;175(23):7697-701.

123. Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. The Journal of antimicrobial chemotherapy. 2002;49(3):561-5.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Fatma	Soyadı	ERDEM
Doğ.Yeri	İstanbul	Doğ.Tar.	09.11.1983
Uyruğu	Türkiye Cumhuriyeti	TC Kim No	32323454062
Email	dr.akfatma@hotmail.com	Tel	05306972802

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Doktora		
Yük.Lis.		
Lisans	İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	
Lise	Gedikataş Yabancı Dil Ağırlıklı Lise - İstanbul	

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	İyi	İyi	78.8	

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
End note	İyi
Mendeley	İyi
Excell	İyi
Gel compare II	İyi

Poster ve sözlü bildiriler ;

1) The First Enterobacter cloacae Co-producing NDM and OXA-48 Carbapenemases and Interhospital Spread of OXA-48 and NDM Producing *Klebsiella pneumoniae*,

Hacıseyitoğlu D, Dokutan A, Abulaila A, Erdem F, Cağ Y, Ozer S Istanbul, Turkey, ICAAC/ICC 2015 San Diego, California / September 17-21

2) Comparison of a novel OXA-48 K-SeT test and Blue-Carba test in detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with using PCR as reference method. Abulaila A, Erdem F, Aktas Z, Oncul O Abstract #5094. E-poster-EPO-232 ECCMID Congress 2016, Amsterdam, Netherlands.

3) In vitro evaluation of double carbapenem and colistin combinations against OXA-48, NDM and KPC carbapenemase-producing colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Fatma Erdem¹, Ayham Abulaila¹, Mustafa Fevzi Ozsoy², Osman Şahingöz³, Zerrin Aktas¹, Oral Öncül⁴ Abstract #5511. E-poster-EVO-430 ECCMID Congress 2016, Amsterdam, Netherlands.

4) Türkiye’de ilk kez NDM-1 Karbapenemaz üreten ve Inc I2, IncA/C ile Inc Y plazmitlerini taşıyan *Escherichia coli* ST471 Enfeksiyonu, Mahir Kapmaz, Fatma Erdem, Ayham Abulaila, Erhan Yeniaras, Oral Oncul, Zerrin Aktas., KLİMİK 30.YIL ÇALIŞTAYI 2016, Antalya

Kongre ve kurslar ;

- 14th ESCMID Summer School, 4-11 Ağustos 2015, İstanbul – Vaka sunumu
- Deney Hayvanları kullanım sertifikası kursu, 7-18 Ocak 2015,,İstanbul Üniversitesi, Aziz SANCAR Deneysel Tıp ve Araştırma Merkezi
- Yorumlu ve kısıtlı antibyogram kursu 15- 16 Ocak 2016, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul
- 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2016), 09- 12 Nisan, Amsterdam, The Netherlands
- KLİMİK 30 YIL ÇALIŞTAYI, 09 – 12 Mart , Antalya, Türkiye (Sözlü bildiri birincilik ödülü)
- 15th ESMID Summer School, 2-9 Temmuz 2016, Seville, Spain – Vaka sunumu