



**T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE
ETFAL SAğLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZ ÜRETEN
ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA OXA-48
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şevval Arduç Tok

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İstanbul/2025



**T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ ŞİŞLİ HAMİDİYE
ETFAL SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZ ÜRETEN
ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA OXA-48
VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. Şevval Arduç Tok

Tez Danışmanları

Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci

Uzm. Dr. Leyla Genç

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İstanbul/2025

TEŞEKKÜR

Akademik yolculuğumda bana yol gsteren, bilgi birikimi, tecrübesi ve sabrıyla çalışmamın her aşamasında yanımda olan, yönlendirmeleriyle tezime Şekil veren değerli danışman hocam Prof. Dr. Elif Aktaş Sepetci'ye, tez sürecinde katkılarını esirgemeyen, görüő, öneri ve motive edici tutumuyla çalışmamın niteliğini artıran danışman hocam Uzm. Dr. Leyla Genç'e, tez sürecindeki titiz yaklaşımı ve yönlendirmeleriyle çalışmamın Őekillenmesine katkı sağlayan Doç. Dr. Ayşe Barış'a, eğitim sürecim boyunca, bilgi ve tecrübelerini aktararak yetişmemde emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Banu Bayraktar'a, değerli görüőleri ve destekleyici tutumuyla her zaman yanımda olan Doç. Dr. Mehmet Emin Bulut'a, uzmanlık eğitimi süresince yapmış oldukları katkılarından dolayı Uzm. Dr. Murat Öcal'a, Uzm. Dr. Hanife Tutan'a ve Uzm. Dr. Süleyman Pelit'e, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, laboratuvarımızın tüm teknisyenlerine, personellerine ve sekreterlerine, hayatımın her döneminde desteklerini ve sevgilerini hissettiğim aileme, çalışmalarım sırasında hep yanımda olan sevgili eşim ve meslektaşım Yunus Emre Tok'a çok teşekkür ederim.

Bu alışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje Numarası: 2025/027) tarafından desteklenmiştir.

Şevval Arduç Tok

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	iv
ÖZET.....	vii
ABSTRACT	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 ENTEROBACTERALES.....	3
2.1.1 Genel Özellikleri ve Neden Olduğu Enfeksiyonlar	3
2.1.2 Laboratuvar Tanısı	4
2.1.3 Antibiyotik Duyarlılık Profili.....	5
2.2 KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES.....	6
2.3 KARBAPENEMAZLAR.....	6
2.3.1 Ambler Sınıf A Karbapenemazlar.....	7
2.3.2 Ambler Sınıf B Karbapenemazlar	8
2.3.3 Ambler Sınıf D Karbapenemazlar.....	8
2.4 OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZLAR VE VARYANLARI.....	9
2.5 DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERALES EPİDEMİYOLOJİSİ	10
2.5.1 Dünya'da ve Türkiye'de OXA-48 Benzeri Karbapenemaz Üreten Enterobacterales Epidemiyolojisi.....	12
2.6 KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERALES TESPİT YÖNTEMLERİ	14
2.6.1 Karbapenemaz Üretiminin Belirlenmesinin Önemi.....	14
2.6.2 Fenotipik Yöntemler	14
2.6.2.1 Kombinasyon disk testleri:.....	15
2.6.2.2 Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM):.....	16
2.6.2.3 Kolorimetrik yöntemler:.....	16
2.6.2.4 Kültür bazlı yöntemler:	17
2.6.2.5 Matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi:	17
2.6.2.6 İmmunokromatografik yöntemler:	17
2.6.3 Genotipik Yöntemler:.....	18
2.6.3.1 Polimeraz zincir reaksiyonu:.....	18
2.6.3.2 Dizi Analizi:	19
2.6.3.3 Tüm genom dizileme (WGS):.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	20
3.1 BAKTERİYEL İZOLATLAR.....	20
3.2 BAKTERİ TANIMLANMASI VE DUYARLILIK TESTLERİ.....	20
3.3 KARBAPENEMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI.....	21
3.4 DİZİ ANALİZİ İLE OXA-48 VARYANLARININ BELİRLENMESİ..	22

3.5 FENOTİPİK YÖNTEMLER İLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI	24
3.5.1 Karba NP direkt test (CNPt-direkt).....	24
3.5.2 Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM).....	25
3.6 İMİPENEM VE MEROPENEM MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ	26
3.6.1 Katyon-ayarlı Mueller Hinton Broth Hazırlanması	27
3.6.2 Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması	27
3.6.3 Plakların Hazırlanması	27
3.6.4 İnokülasyon ve İnkübasyon.....	28
3.6.5 Sonuçların Değerlendirilmesi.....	29
3.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZ	29
4. BULGULAR	30
4.1 KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES İZOLATLARININ TÜR DAĞILIMI	30
4.2 KARBAPENEMAZ GENLERİNİN TESPİTİNE İLİŞKİN BULGULAR	31
4.3 OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZ POZİTİF İZOLATLARIN DAĞILIMI	34
4.4 OXA-48 VARYANTLARINA İLİŞKİN BULGULAR	35
4.5 FENOTİPİK KARBAPENEMAZ TESPİTİNE İLİŞKİN BULGULAR .	38
4.5.1 Karba NP Direkt Test Sonuçları	38
4.5.2 Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Sonuçları.....	39
4.6 OXA-48 VARYANTLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARINA İLİŞKİN BULGULAR	40
4.7 KARBAPENEM GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYON DEĞERLERİNE İLİŞKİN BULGULAR	44
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	61
KAYNAKLAR	63
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
EKLER	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER VE KISALTMALAR

CDC: U.S. Center for Disease Control and Prevention

CNPt-direkt: Karba NP direkt test

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

CPE: Karbapenemaz Üreten Enterobacterales (Carbapenemase-producing Enterobacterales)

CR: Karbapenem dirençli (Carbapenem-resistant)

CRE: Karbapenem Dirençli Enterobacterales (Carbapenem-resistant Enterobacterales)

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GSBL: Genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz

KAMHB: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth

mCIM: Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu

MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

OXA-48 benzeri: Oksasilinaz-48 benzeri

TABLULAR

Tablo 1. qPZR karışımının içeriği.....	22
Tablo 2. qPZR protokolü.....	22
Tablo 3. Primer dizileri	23
Tablo 4. EUCAST Enterobacterales karbapenem klinik sınır değerleri	29
Tablo 5. Yıllara göre Enterobacterales izolatlarında karbapenem direnç oranları (%)	30
Tablo 6. Çalışma izolatlarının karbapenemaz türlerine göre dağılımı.....	31
Tablo 7. Tek başına ve ikili OXA-48 benzeri karbapenemazların yıllara göre dağılımı	35
Tablo 8. OXA-48 varyantlarının tek ve ikili karbapenemaz üretimine göre dağılımı	37
Tablo 9. OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif Enterobacterales izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları	41
Tablo 10. OXA-48 varyantlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları	42
Tablo 11. Varyantlara göre tek ve ikili karbapenemaz üreticilerinin meropenem ve imipenem duyarlılıkları	43
Tablo 12. OXA-48 varyantlarına göre <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları	44
Tablo 13. OXA-48 varyantlarının meropenem ve imipenem MİK ₅₀ -MİK ₉₀ değerleri	45
Tablo 14. OXA-48 varyantlarının bakteri türüne göre meropenem ve imipenem MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri.....	47
Tablo 15. İzolatların GSBL üretimine göre meropenem ve imipenem MİK ₅₀ ve MİK ₉₀ değerleri	50

ŞEKİLLER

Şekil 1. Beta-laktamazların moleküler ve fonksiyonel sınıflandırılması.....	7
Şekil 2. Karba NP direkt test değerlendirilmesi.....	25
Şekil 3. mCIM değerlendirilmesi.....	26
Şekil 4. Antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması	28
Şekil 5. CRE izolatlarının tür dağılımı.....	31
Şekil 6. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni amplifikasyon eğrisi.....	32
Şekil 7. OXA-48 benzeri ve NDM karbapenemaz genleri amplifikasyon eğrisi.....	33
Şekil 8. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni pozitif izolatların (n:368) tür dağılımı	34
Şekil 9. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> izolatlarında OXA-48 varyantlarının dağılımı	35
Şekil 10. Diğer Enterobacterales türlerinde OXA-48 varyantlarının dağılımı	36
Şekil 11. OXA-48 varyantlarının yıllara göre dağılımı	38
Şekil 12. OXA-48 varyantlarına göre Karba NP direkt test sonuçları.....	39
Şekil 13. OXA-48 varyantlarına göre mCIM sonuçları.....	40
Şekil 14. Sıvı mikrodilüsyon plağında temsili MİK sonuçları.....	45
Şekil 15. OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı	46
Şekil 16. OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı	46
Şekil 17. <i>E. coli</i> izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı	48
Şekil 18. <i>E. coli</i> izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı	48
Şekil 19. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı	49
Şekil 20. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı	50

OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERALES İZOLATLARINDA OXA-48 VARYANTLARININ ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Karbapeneme dirençli Enterobacterales (CRE), sınırlı tedavi seçenekleri ve yüksek mortalite nedeniyle kritik öncelikli patojenler olarak kabul edilmektedir. Türkiye, CRE ve OXA-48 benzeri karbapenemazlar için endemik bölgeler arasında yer almaktadır. OXA-48 benzeri karbapenemazlar farklı fenotipik özellikleri ve direnç profilleri nedeniyle klinik laboratuvarlarda önemli tanısal zorluklar yaratmaktadır. OXA-48 benzeri karbapenemazlar, küçük amino asit değişiklikleri ile birbirinden farklılık gösteren, şu ana kadar tanımlanmış 60'dan fazla varyant içermektedir. Bu çalışmanın amacı, CRE izolatlarında OXA-48 benzeri karbapenemaz genlerinin oranını, OXA-48 varyantlarının dağılımını, varyantların diğer antibiyotiklere ve karbapenemlere duyarlılık profilleri ve karbapenem MİK düzeyleri arasındaki farkları araştırmaktır. Ayrıca varyantlara göre tek ya da ikili karbapenemaz üretimi ve fenotipik karbapenemaz tespit yöntemlerinin duyarlılığının değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Gereç ve Yöntem: Ocak 2019-Aralık 2023 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden elde edilen 703 CRE izolatı çalışmaya dahil edilmiştir. İzolatlar VITEK® MS sistemi (BioMerieux, Fransa) ile tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları VITEK® 2 COMPACT (BioMerieux, Fransa) ile belirlenmiştir. Karbapenem direnci, ertapenem, imipenem ve meropenemden en az birine dirençli izolatlarda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Kanada) doğrulanmış ve EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Karbapenemaz genleri, Biospeedy Karbapenem Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılarak belirlenmiştir. OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının tespiti için dizi analizi gerçekleştirilmiştir. OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarına Karba NP direkt test ve mCIM yapılmıştır. Varyantlarda imipenem ve meropenem MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Bulgular: Çalışmamızda, CRE izolatlarının %52,3'ünde OXA-48 benzeri karbapenemaz tespit edilmiştir. İzolatların %17,2'sinde NDM ve %12'sinde KPC

karbapenemaz geni saptanmıştır. *K. pneumoniae*, OXA-48 benzeri pozitif izolatların %80,7'sini oluşturan baskın tür olmuştur. OXA-48 benzeri karbapenemazların %11,7'si diğer karbapenemaz genleri ile birliktelik göstermektedir. Çalışmamızda tespit edilen OXA-48 varyantları; OXA-48/245 (%39,1), OXA-232 (%36,4), OXA-181 (%17,6), OXA-244 (%5,1), OXA-162 (%1,3) ve OXA-1200 (%0,2) olmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarında en sık OXA-48/245 ve OXA-232, *E. coli* izolatlarında ise OXA-232 tespit edilmiştir. Diğer karbapenemaz genleri ile en sık birliktelik gösteren varyant OXA-48/245 olmuştur ($p=0,015$). Karba NP direkt test negatif grupta en yaygın varyant OXA-244 olmuştur. OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların meropenem ve imipenem duyarlılık oranları sırasıyla %31 ve %39,1 olarak saptanmıştır. OXA-181, OXA-232 ve OXA-48/245 varyantlarının meropenem ve imipenem MİK₅₀ değerleri OXA-244 varyantına göre yüksek bulunmuştur. *E. coli* izolatlarında OXA-232 varyantında diğer varyantlara göre meropenem MİK₅₀ değeri anlamlı yüksek saptanmıştır ($p=0,003$). *K. pneumoniae* izolatlarında varyantlara göre karbapenem MİK₅₀ değerlerinde anlamlı fark saptanmazken, OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181'de meropenem direnç oranları diğer varyantlara göre yüksek saptanmıştır ($p=0,031$). İkili karbapenemaz üreticilerinde imipenem ve meropenem MİK₅₀ değerleri tekli karbapenemaz üreticilerine göre yüksek saptanmıştır.

Sonuç: Bu çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemazların farklı varyantlarının dağılımı, fenotipik özellikleri ve antimikrobiyal direnç profilleri kapsamlı bir şekilde ele alınmıştır. Bulgular, karbapenemaz varyantlarının direnç profilleri ve MİK değerleri üzerinde belirgin farklılıklar yaratabileceğini ve fenotipik testlerin duyarlılığının varyantlar arasında değişebileceğini göstermektedir. OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının bölgesel dağılımının ve bunların direnç profilleri ile ilişkisinin aydınlatılması, bu dirençli patojenlerin yayılmasını azaltmak için hedeflenen önleme stratejileri, gelişmiş tanı yaklaşımları ve etkili antimikrobiyal yönetim için önemlidir.

Anahtar kelimeler: OXA-48 benzeri karbapenemaz, varyant analizi, MİK, direnç

INVESTIGATION OF OXA-48 VARIANTS IN ENTEROBACTERIALES ISOLATES PRODUCING OXA-48-LIKE CARBAPENEMASES

ABSTRACT

Aim: Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) are recognised as critical priority pathogens due to limited treatment options and high mortality. Turkey is among the endemic regions for CRE and OXA-48-like carbapenemases. OXA-48-like carbapenemases pose significant diagnostic challenges in clinical laboratories due to their different phenotypic characteristics and resistance profiles. OXA-48-like carbapenemases include more than 60 variants identified so far, which differ from each other by small amino acid changes. This study aimed to investigate the ratio of OXA-48-like carbapenemase genes in CRE isolates, distribution of OXA-48 variants, susceptibility profiles of variants to other antibiotics and carbapenems and differences between carbapenem MIC levels. In addition, it aimed to evaluate the sensitivity of single or dual carbapenemase production and phenotypic carbapenemase detection methods according to the variants.

Materials and Methods: Between January 2019 and December 2023, 703 CRE isolates obtained from various clinical samples were included in the study. The isolates were identified by the VITEK® MS system (BioMérieux, France). Antibiotic susceptibilities were determined by VITEK® 2 COMPACT (BioMerieux, France). Carbapenem resistance was confirmed by Kirby-Bauer disc diffusion method (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Canada) in isolates resistant to at least one of ertapenem, imipenem, and meropenem and evaluated according to EUCAST criteria. Carbapenemase genes were determined using the Biospeedy Carbapenem Resistance qPCR kit (Bioeksan, Turkey). Sequence analysis was performed for the detection of OXA-48-like carbapenemase variants. Carba NP direct test and mCIM were performed on OXA-48-like carbapenemase variants. For the variants, imipenem and meropenem MIC values were determined by the broth microdilution method.

Results: In our study, OXA-48-like carbapenemase was detected in 52.3% of CRE isolates. NDM and KPC carbapenemase genes were detected in 17.2% and 12%

of the isolates, respectively. *K. pneumoniae* was the dominant species, accounting for 80.7% of the OXA-48-like positive isolates. 11.7% of OXA-48-like carbapenemases were in association with other carbapenemase genes. OXA-48 variants detected in our study were OXA-48/245 (39.1%), OXA-232 (36.4%), OXA-181 (17.6%), OXA-244 (5.1%), OXA-162 (1.3%), and OXA-1200 (0.2%). The most common carbapenemase genes were OXA-48/245 and OXA-232 in *K. pneumoniae* isolates and OXA-232 in *E. coli* isolates. The variant showing the most frequent association with other carbapenemase genes was OXA-48/245 ($p=0.015$). The most common variant in the Karba NP direct test negative group was OXA-244. The susceptibility rates of OXA-48-like carbapenemase-producing isolates to meropenem and imipenem were 31% and 39.1%, respectively. Meropenem and imipenem MIC values of OXA-181, OXA-232, and OXA-48/245 variants were higher than OXA-244 variant. In *E. coli* isolates, the meropenem MIC value of the OXA-232 variant was significantly higher than other variants ($p=0.003$). In *K. pneumoniae* isolates, no significant difference was found in carbapenem MIC values according to variants, while meropenem resistance rates were higher in OXA-48/245, OXA-232, and OXA-181 compared to other variants ($p=0.031$). MIC values of imipenem and meropenem were higher in dual carbapenemase producers compared to single carbapenemase producers.

Conclusion: In this study, the distribution, phenotypic characteristics, and antimicrobial resistance profiles of different variants of OXA-48-like carbapenemases were comprehensively analysed. The findings show that carbapenemase variants can create marked differences in resistance profiles and MIC values and that the sensitivity of phenotypic tests may vary between variants. Elucidating the regional distribution of OXA-48-like carbapenemase variants and their association with resistance profiles is important for targeted prevention strategies, improved diagnostic approaches, and effective antimicrobial stewardship to reduce the spread of these resistant pathogens.

Keywords: OXA-48-like carbapenemase, OXA-48 variant analysis, MIC, carbapenem resistance

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antimikrobiyal direnç, küresel ölçekte halk sağlığını tehdit eden ciddi bir sorundur. Antimikrobiyallere karşı direncin hızla artışı ve yayılması, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde güçlükler yol açmaktadır. Bu durum hastanede kalış süresinde, mortalitede, sosyal ve ekonomik maliyetlerde artışa neden olmaktadır.

Karbapenem grubu antibiyotikler, çok ilaca dirençli Enterobacterales üyelerinin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için en etkili antibiyotiklerdendir. Karbapenemlerin klinik tedavide yaygın olarak kullanılmasıyla birlikte, karbapeneme dirençli Enterobacterales'in (CRE) oranı hızla artmıştır. CRE Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) 2024 yılında yayınladığı kritik öncelikli bakteriyel patojenler raporunda kritik grupta yer almaktadır (1). "Orta Asya ve Doğu Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (CAESAR)" tarafından 2023 yılında yayınlanan son verilere göre, Türkiye'de özellikle *Klebsiella pneumoniae*'da karbapenemlere direnç oranı %50'lere ulaşmıştır (2).

Enterobacterales türlerinde karbapenem direncine yol açan en önemli mekanizmalardan biri karbapenemaz üretimidir. Karbapenemazlar, geniş etki spektrumuna sahip beta laktam grubu olan karbapenemlerden (meropenem, imipenem, ertapenem vb.) en az birini hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanır. Ambler sınıflandırmasında moleküler özelliklerine göre Sınıf A (KPC), Sınıf B (MBL) (VIM, IMP, NDM) ve Sınıf D (OXA) olmak üzere üç grupta sınıflandırılırlar. Türkiye'de karbapenemaz üreten Enterobacterales (CPE) endemik kategoride bulunmakta olup, OXA-48 karbapenemaz geni ilk kez 2001 yılında Türkiye'de bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır (3, 4). OXA-48 benzeri karbapenemazlar esas olarak Kuzey Afrika ülkeleri, Orta Doğu, Türkiye ve Hindistan'da tanımlanmıştır ve Enterobacterales türlerinde geniş bir dağılıma sahip oldukları tespit edilmiştir (5). OXA-48 benzeri karbapenemazlar, küçük amino asit değişiklikleri ile birbirinden farklılık gösteren, şu ana kadar tanımlanmış 60'dan fazla varyant içermektedir. OXA-48 benzeri karbapenemaz grubunda OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204, OXA-162 ve OXA-244 en sık tanımlanan varyantlardır. Bu enzimler plazmidler aracılığıyla yayılmaktadır ve bu plazmidler bakteriler arasında yatay gen transferini kolaylaştırarak direnç mekanizmalarının yayılmasını arttırmaktadır.

Enterobacterales türlerinde OXA-48 benzeri karbapenemazların tespiti; hasta yönetimi, enfeksiyon kontrol önlemleri, antimikrobiyal tedavi stratejileri ve epidemiyolojik sürveyans açısından önem taşımaktadır. Ancak OXA-48 benzeri karbapenemazların fenotipik tespiti, zayıf hidrolitik aktiviteleri nedeniyle klinik laboratuvarlar için önemli zorluklar oluşturmaktadır. Bu durum, fenotipik yöntemler ile elde edilen sonuçların genotipik yöntemler ile doğrulama ihtiyacını arttırabilmektedir. Dünya’da ve Türkiye’de karbapenemaz genleriyle ilgili yapılmış çok sayıda araştırma olmakla birlikte OXA-48 benzeri karbapenemaz geni varyantlarının incelendiği çalışmalar sınırlıdır. OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının karbapenem direnciyle ilişkisi incelendiğinde, bu antibiyotiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) varyantlar arası farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir (6).

Bu çalışmanın amacı, CRE izolatlarında OXA-48 benzeri karbapenemaz genlerinin oranını, OXA-48 varyantlarının dağılımını, varyantların diğer antibiyotiklere ve karbapenemlere duyarlılık profilleri ve karbapenem MİK düzeyleri arasındaki farkları araştırmaktır. Ayrıca varyantlara göre tek ya da ikili karbapenemaz üretimi ve fenotipik karbapenemaz tespit yöntemlerinin duyarlılığının değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, CRE izolatlarında OXA-48 benzeri karbapenemazların epidemiyolojik yaygınlığı ve moleküler özelliklerinin ortaya konulması, böylece bu enzimlerin klinik önemi vurgulanarak enfeksiyon kontrol önlemleri, antimikrobiyal tedavi stratejileri ve sürveyans çalışmalarına bilimsel katkı sağlanması amaçlanmıştır.

Ülkemizde bu kapsamda yapılmış detaylı çalışma sayısı oldukça sınırlıdır. Geniş numune sayısı ve incelenen parametre çeşitliliği göz önüne alındığında, çalışmamızın İstanbul’dan bildirilen OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının dağılımı ve özelliklerini bu düzeyde ele alan ilk çalışma ve ülke genelinde gerçekleştirilen en kapsamlı araştırmalardan biri niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 ENTEROBACTERALES

2.1.1 Genel Özellikleri ve Neden Olduğu Enfeksiyonlar

Enterobacterales, Gammaproteobacteria sınıfına ait, spor oluşturmeyen fakültatif anaerobik Gram-negatif basillerden oluşan geniş ve çeşitli bir gruptur. Enterobacterales takımında yedi aile yer almaktadır: *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Erwiniaceae*, *Yersiniaceae* ve *Budvicaceae* (7). Takım içindeki en büyük aile 33 cins içeren *Enterobacteriaceae* ailesidir.

Enterobacteriaceae ailesi, hayvanların ve insanların intestinal sisteminde, toprakta, suda, bitkilerde bulunabilen mikroorganizmalar olup bakteriyemi, idrar yolu enfeksiyonları ve birçok bağırsak enfeksiyonu olmak üzere çeşitli hastalıklara yol açabilirler. *Salmonella Typhi*, *Shigella spp.*, *Yersinia pestis* gibi türleri primer enfeksiyona; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* gibi türleri ise fırsatçı enfeksiyona yol açan mikrobiyota üyeleridir (8).

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden *Klebsiella* türleri sağlıklı bireylerin burun, boğaz, bağırsak ve deri mikrobiyotasında bulunan fırsatçı patojenlerdir. Altı tür içeren (*K. pneumoniae alt türleri pneumoniae, rhinoscleromatis ve ozaenae, K. oxytoca, K. granulomatis, K. variicola, K. singaporensis ve K. alba*) bu cinsin üyeleri, mukoid koloni yapısına ve organizmaların in vivo virülansının artmasından sorumlu olan belirgin bir kapsüle sahiptir. Bu cinsin en sık izole edilen üyeleri, toplum veya hastane kaynaklı pnömونيye neden olabilen *K. pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca*'dır. Bu bakteriler ayrıca yara ve yumuşak doku enfeksiyonlarına ve idrar yolu enfeksiyonlarına da neden olur (8). 1980'li yıllarda Asya-Pasifik kıyılarındaki ülkelerden yayınlanan raporlara göre *K. pneumoniae*'nın, klasik *K. pneumoniae*'den (cKp) daha virülan olan, sağlıklı toplum bireylerini enfekte edebilen klinik bir varyantı, hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKp) olarak tanımlanmıştır (9).

E. coli, *Escherichia* cinsinin en yaygın ve önemli türüdür. Gastroenterit gibi intestinal; üriner sistem enfeksiyonları, pnömوني, neonatal menenjit, peritonit, yumuşak doku enfeksiyonları ve sepsis gibi ekstraintestinal enfeksiyonlara neden

olabilir. Toplum kaynaklı ve sağlık bakımı ilişkili, komplike ve komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarının en sık etkeni üropatojenik *E. coli*'dir (UPEC) (10). Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Vero veya Shiga-toksin üreten *E. coli* (VTEC veya STEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) ve diffüz aderent *E. coli* (DAEC) intestinal patojenlerdir. *E. coli* sıklıkla bunu plazmidler aracılığıyla ve edindikleri virülans faktörleri ile enfeksiyona yol açar ancak gastrointestinal kanalda bulunan bakteri, özellikle bağışıklığı baskılanmış ya da cerrahi operasyon geçirmiş kişilerde fırsatçı patojen olabilir (8). Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'nin (CDC) sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonları izlemek için kullanılan Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı (NHSN) özet raporunda, *E. coli* ve *K. pneumoniae* sırasıyla ilk ve üçüncü sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon etkenleri olarak yerini almıştır (11).

Enterobacter, *Citrobacter*, *Morganella* ve *Serratia*'nın neden olduğu birincil enfeksiyonlar sağlıklı bireylerde nadir olup, bu mikroorganizmalar yenidoğanlarda ve immün düşkün bireylerde hastane kaynaklı enfeksiyonların daha yaygın nedenleridir (8). İnsanda patojen olan *Proteus* türleri, *P. mirabilis* ve *P. vulgaris*'tir. En yaygın üyesi olan *P. mirabilis*; *E. coli* ve *K. pneumoniae*'den sonra en sık üriner sistem enfeksiyon etkenidir (10). Üreaz aktivitesi bulunan *P. mirabilis*, idrar pH'ını yükselterek magnezyum ve kalsiyumun çökelti oluşturmaya ve böylelikle böbrekte taş oluşumuna neden olabilir. İdrarın alkalileşmesi, üroepitelyuma zarar veren faktörlerden biridir (8).

2.1.2 Laboratuvar Tanısı

Enterobacterales türlerinin tanımlanmasında ilk adım gram boyama ve koloni morfolojisinin değerlendirilmesidir. Bakteriler gram boyama ile kısa, dolgun, gram negatif basiller veya kokobasiller olarak görülebilirler. *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri birkaç istisna haricinde glukozu fermente eder, oksidaz reaksiyonları negatiftir ve nitratı nitrite indirgerler. Laktoz fermentasyonu, motilite, H₂S üretimi ve üreaz aktivitesi gibi biyokimyasal özellikler ile aile üyeleri birbirinden ayırt edilebilir.

Bu organizmaların kesin olarak tanımlanmasında geleneksel laboratuvar testleri olan biyokimyasal testlerin yanı sıra, ticari olan biyokimyasal testler, otomatize sistemler, MALDI-TOF MS ve moleküler tanı yöntemleri kullanılır.

2.1.3 Antibiyotik Duyarlılık Profili

Enterobacterales türlerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sefalosporinler, beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları, aminoglikozidler, florokinolonlar ve karbapenemler kullanılabilir (12). Bu mikroorganizmalar, kazanılmış ya da kromozomal enzimler (genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, karbapenemazlar), dış membran porinlerinde ve penisilin bağlayıcı proteinlerde değişiklikler ve dışa atım pompaları ile antibiyotiğin hücre dışına atılması aracılığıyla antimikrobiyallere direnç geliştirebilirler (13).

En önemli direnç mekanizmalarının başında beta-laktamaz enzimlerinin sentezlenmesi gelmektedir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimleri, sefuroksim, 3. ve 4. kuşak sefalosporinler ve aztreonam da dahil olmak üzere penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize eden, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemeyen enzimlerdir. Enterobacterales üzerinde GSBL genleri çoğunlukla plazmid aracılığıyla yayılım göstererek direnç gelişimine katkıda bulunur. AmpC tipi sefalosporinazlar, penisilinleri, sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Bu beta-laktamazlar, 3. kuşak sefalosporinleri hidrolize ederken, 4. kuşak sefalosporinleri genellikle etkilemezler. AmpC beta-laktamazlar kromozomal olarak bulunan veya GSBL'lere benzer şekilde, plazmidlerle taşınan genler tarafından kodlanır. *Enterobacter spp*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii*, *Serratia spp*, *Hafnia spp*. türleri indüklenebilir kromozomal AmpC bulundururken, *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *P. mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp*. kazanılmış AmpC üreticileridir (14).

ECDC/WHO 2021 verilerinin yer aldığı, 2023 yılında yayınlanan Avrupa'da Antimikrobiyal Direnç Sürveyansı Raporu'na göre Avrupa ülkelerinde invaziv *E. coli* izolatlarında üçüncü kuşak sefalosporin direnci %13,8, florokinolon direnci %21,9, aminoglikozid direnci %9,6 ve karbapenem direnci %0,2 iken, Türkiye'de üçüncü kuşak sefalosporin direnci %50,2, florokinolon direnci %50,9, aminoglikozid direnci %24,6 ve karbapenem direnci %4,7 olarak bildirilmiştir (2). İnvaziv *K. pneumoniae* izolatlarında ise üçüncü kuşak sefalosporin direnci %34,3, florokinolon direnci %33,6,

aminoglikozid direnci %23,7 ve karbapenem direnci %11,7 iken Türkiye’de bu oranlar sırasıyla %75,4, %68,6, %43,2 ve %49,1’dir (2).

2.2 KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES

Karbapenem grubu antibiyotiklerden (meropenem, ertapenem, imipenem, doripenem) en az birine dirençli ya da karbapenem direncine neden olduğu bilinen enzimleri ürettiği saptanmış Enterobacterales izolatları CRE olarak adlandırılır (15).

Karbapenem dirençli Enterobacterales enfeksiyonları sağlık hizmeti verilen ortamlarda giderek daha yaygın ortaya çıkarak dünya genelinde artan bir endişe kaynağı olmaktadır (16). ECDC/WHO’nun 2023 yılında yayınladığı raporda 2017-2021 yılları arasındaki beş yıllık süreçte Türkiye’deki invaziv *E. coli* izolatlarında karbapenem direncinin %2,7’den %4,7’ye, invaziv *K. pneumoniae* izolatlarında ise %32,5’den %49,1’e yükseldiği ve direncin artış eğiliminde olduğu belirtilmiştir (2).

Enterobacterales türlerinde karbapenem direncinin ana mekanizması karbapenemaz üretimidir (17). Karbapenemlere karşı fenotipik direnç, genellikle karbapenemazların kazanılması veya sefalosporinazların üretimi ile bakteri hücre duvarının karbapenemlerin girişine karşı geçirgenliğini azaltan mutasyonların bir araya gelmesinden kaynaklanmaktadır (18). Karbapenemaz üreten organizmalar, geçirgenlik durumlarına, ilişkili enzim tarafından karbapenem hidroliz oranına ve gen ekspresyon düzeyine bağlı olarak karbapenem MİK değerlerinde önemli farklılıklar gösterebilir (18). Bu direnç mekanizmalarının en sık tanımlandığı organizmalar, *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *E. cloacae* kompleks gibi sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlara neden olan en yaygın türlerdir. CRE sayısındaki artışın klonal grupların genişlemesi ve yatay gen transferinden kaynaklandığı düşünülmektedir (19).

2.3 KARBAPENEMAZLAR

Karbapenemazlar, penisilinleri, çoğu zaman sefalosporinleri ve değişen düzeylerde karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır. Monobaktamlar, metallo-beta-laktamazlar tarafından hidrolize edilemezler (14).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında sıklıkla Ambler’in moleküler sınıflaması ve Bush-Jacoby-Medeiros’un fonksiyonel sınıflaması kullanılır. Beta-laktamazların moleküler ve fonksiyonel sınıflandırılması Şekil 1’de gösterilmiştir.

Beta-laktamazlar													
Aktif Bölge	Serin						Metallo (Zn ²⁺)						
Moleküler Sınıf	a			c			d			b			
Fonksiyonel Grup	2						1			3			
Fonksiyonel Subgruplar	2a	2b	2be	2ber	2c	2f	1	1e	2d	2de	2df	3a	3b
Substratlar	P	P, Cp	P, Cp	E, M	P	P	P, Cp, E, M	Cp, E	P	P, E	M	P, Cp, E, Cb	Cb
Avibaktam ile inhibisyon	+	+	+	+	+	+	+/-	-	+	+	+	-	-
Klavulanik Asit ile inhibisyon	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
EDTA ile inhibisyon	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Şekil 1. Beta-laktamazların moleküler ve fonksiyonel sınıflandırılması

AV, avibaktam; CA, klavulanik asit; Cb, karbapenem; Cp, sefalosporin; E, genişlemiş spektrumlu sefalosporin; M, monobaktam; P, penisilin.
[Bush K. çalışmasından uyarlanmıştır (20).]

Ambler'in moleküler sınıflamasında beta-laktamazlar Sınıf A, C ve D serin beta-laktamazlar ve Sınıf B metallo-beta-laktamazlar (MBL) olarak dört gruba ayrılır. MBL'lerin aktif bölgesinde çinko yer alırken, Sınıf A, C ve D'de serin amino asidi yer alır (20).

Karbapenemaz enzimleri plazmid aracılı, kazanılmış enzimlerdir. *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz (KPC), Yeni Delhi metallo-beta-laktamaz (NDM), IMP (İmipenemaz), Oksasilinaz (OXA) ve Verona integron aracılı metallo-beta-laktamaz (VIM) dahil olmak üzere çeşitli Ambler sınıf A, D ve B enzimleri karbapenemleri inaktive eder (17).

2.3.1 Ambler Sınıf A Karbapenemazlar

Ambler Sınıf A serin karbapenemazlar *Klebsiella spp.*, *E. cloaca*, *S. marcescens* türlerinde tespit edilmiştir. İçerdiği üç ana enzim ailesi NMC/IMI (not metallo-enzyme carbapenemase/ imipenem hidrolize edici beta-laktamaz), SME (*Serratia marcescens* enzimi) ve KPC'dir. Tümü penisilinleri, aztreonamı, sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir ve hepsi klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilerek fonksiyonel grup 2f'de yerleşmiştir. Dördüncü bir üye olan GES (Guiana extended spectrum) başlangıçta GSBL olarak tanımlanmış, sonrasında düşük düzeyde imipenemi hidrolize eden

varyantları keşfedilmiştir. SME, NMC ve IMI kromozomal olarak kodlanmış enzimler iken KPC ve GES plazmid aracılıdır (18).

2.3.2 Ambler Sınıf B Karbapenemazlar

Bu sınıfın enzimleri, karbapenemlere ek olarak, çoğu sefalosporinleri ve penisilinleri hidrolize etme yeteneğine sahiptir ancak aztreonamı hidrolize edemez. Enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonları ile beta laktamların etkileşimi hidroliz mekanizmasını açıklamaktadır. Böylelikle çinko gibi katyonların bir şelatörü olan Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve Dipikolinik asit (DPA) tarafından inhibe olabilmeleri ayırt edici özellikleridir (18).

B sınıfı enzimler substrat profillerindeki farklılıklara, aktif bölgedeki amino asit dizisine, çinko ligandlarına dayanarak üç alt sınıfa (B1, B2 ve B3) ayrılır. NDM (New Delhi MBL), VIM (Verona integron aracılı MBL) ve IMP (İmipenemaz) enzimleri gibi önemli plazmid aracılı MBL'ler B1 alt sınıfına aittir. SPM (Sao Paulo MBL) ve GIM (German imipenemaz) enzimleri de bu sınıftadır. MBL'ler klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam veya avibaktam tarafından inhibe edilmezler (21).

2.3.3 Ambler Sınıf D Karbapenemazlar

Oksasilinaz olarak bilinen Sınıf D beta-laktamazlar oksasilini ve kloksasilini hidrolize etme yeteneğine sahiptir ve aktif bölgesinde serin amino asidi bulunur. Fonksiyonel sınıflamada 2df'de karbapenem hidrolitik aktivitesine sahip OXA beta-laktamazlar bulunurken, karbapenem hidrolitik aktivitesi olmayanlar 2d ve 2de alt gruplarında bulunmaktadır (20). Sınıf D en çeşitli enzimleri içeren beta-laktamaz sınıfıdır. Bu çeşitlilik, genetik ve biyokimyasal düzeylerde gözlenmekte olup, enzimler dar ya da geniş bir hidroliz spektrumuna sahiptir.

OXA enzimleri dört ana gruba ayrılmıştır. Sefalosporinlere veya karbapenemlere zayıf hidrolitik aktivite gösteren edinilmiş dar spektrumlu sınıf D beta-laktamazlar Grup I (OXA-1, OXA-2 ve OXA-101), belirli genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri (özellikle seftriakson ve sefepim) hidrolize edebilen edinilmiş genişlemiş spektrumlu sınıf D beta laktamazlar Grup II (dar spektrumlu sınıf D beta-laktamazların nokta mutantları) olarak sınıflandırılmıştır. Grup III, karbapenemlere karşı zayıf hidrolitik aktiviteye sahip edinilmiş karbapenem hidrolize edici sınıf D

beta-laktamazları içermektedir. Bu grupta, *Acinetobacter* türleri arasında yaygın olan OXA-23 benzeri enzimler ile Enterobacterales türlerinde karbapenem direncinin önemli bir nedeni olan OXA-48 benzeri enzimler bulunmaktadır. Grup IV ise doğal olarak oluşan D sınıfı beta-laktamazlardır (*Acinetobacter baumannii* kompleksindeki OXA-51 benzeri alt grup) (22). Plazmid aracılığıyla horizontal geçiş göstererek kolayca yayılan OXA-48 benzeri karbapenemazlar, Enterobacterales türlerinde dünya genelinde giderek daha yaygın hale gelmiştir.

2.4 OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZLAR VE VARYANTLARI

OXA-48 benzeri karbapenemazlar, penisilinleri güçlü bir şekilde hidrolize ederken, geniş spektrumlu sefalosporinler ve karbapenemler üzerinde daha zayıf hidrolitik aktivite göstermektedir. Bu enzimlerde görülen düşük karbapenem MİK seviyeleri, bu direnç mekanizmasını barındıran suşların tespitini zorlaştırarak tedavi başarısızlığına yol açabilir (23). 2001 yılında Türkiye’de bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmasının ardından, OXA-48 benzeri ve varyantları *K. pneumoniae*’da ve diğer Enterobacterales türlerinde yaygın olarak görülmeye başlamıştır (24).

OXA-48 benzeri karbapenemazlar, OXA-48 enziminden küçük amino asit değişiklikleri ile farklılaşmış varyantlardan oluşmaktadır. Bu değişiklikler, varyantların enzim aktivitesinde ve antibiyotik duyarlılık profilinde farklılıkları neden olabilir. 2 Mayıs 2025’de güncellenen beta-laktamaz veri tabanında Sınıf D’de tanımlanmış 1429 enzim, OXA enzim ailesine ait 1376 enzim, OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantı olan ise 68 enzim bulunmaktadır (25).

OXA-48 varyantının karbapenemlere karşı düşük düzeyde hidrolitik aktiviteye sahip olduğu ve imipeneme karşı meropenemden daha fazla aktivite gösterdiği ortaya koyulmuştur. Son yirmi yılda tanımlanan varyantlar arasında olan OXA-181 ve OXA-232, OXA-48 ile benzer hidrolitik aktiviteye sahiptir. OXA-181 OXA-48’den dört amino asit değişikliği ile farklılık gösterirken; OXA-232, OXA-48 ve OXA-181’den sırasıyla beş ve bir amino asit farklıdır. Bu farklılıkları, OXA-232’nin substrat özgüllüğünü ve hidroliz aktivitesini etkileyen farklı enzimatik özelliklerine katkıda bulunur. OXA-232’nin imipenemi hidrolize etme kapasitesi OXA-181 ve OXA-48’den daha zayıfken, temosilin hariç tüm penisilinleri daha iyi bir şekilde hidrolize

etmektedir. OXA-162, OXA-48'den bir amino asit değişikliği ile farklılık gösterirken, meropenem hariç diğer karbapenemleri OXA-48'den daha iyi hidrolize etmektedir (26). OXA-244 tek bir amino asit değişikliği ile OXA-48'den farklılık gösterir. OXA-244, OXA-48 ile karşılaştırıldığında, temosilin ve karbapenemleri (özellikle imipenem ve meropenem) daha zayıf hidrolize etmektedir (27). OXA-163 ve OXA-405 gibi genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eden ancak karbapenemlere karşı sınırlı aktivite gösteren OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantları, karbapenemaz olarak adlandırılmak için yeterli karbapenem hidrolitik aktivitesine sahip olmayan, GSBL fenotipi gösteren varyantlardır (28). OXA-204, iki amino asit değişikliği ile OXA-48'den farklılık gösterirken, benzer hidrolitik aktivite özelliklerine sahiptir (29).

Küresel ölçekte yapılan ATLAS sürveyans çalışmasında OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinin varyantları incelenmiş, en sık tespit edilen varyantlar sırasıyla OXA-232, OXA-48, OXA-181 olurken, OXA-244, OXA-370, OXA-162 ve OXA-484 tespit edilen diğer varyantlar olmuştur. OXA-48 benzeri enzim saptanan izolatlarda meropenem duyarlılığı %12,5 ve imipenem duyarlılığı %6,9 bulunmuştur. OXA-232 saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında meropenem duyarlılığı %3,6, imipenem duyarlılığı %5,5 iken, *E. coli* izolatlarında meropenem duyarlılığı %57,9, imipenem duyarlılığı %63,2 olarak tespit edilmiştir. OXA-48 saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında meropenem duyarlılığı %20,3, imipenem duyarlılığı %6,6 iken, *E. coli* izolatlarında meropenem duyarlılığı %46,2, imipenem duyarlılığı %11,5 olarak tespit edilmiştir. OXA-181 saptanan *K. pneumoniae* izolatlarında meropenem duyarlılığı %25,5, imipenem duyarlılığı %15,4 iken, *E. coli* izolatlarında meropenem duyarlılığı %81, imipenem duyarlılığı %50 olarak tespit edilmiştir. Varyantlar arasında karbapenem duyarlılıklarında gözlemlenen farklılıklar ile aynı varyantın farklı türlerde karbapenemlere değişken duyarlılık göstermesi dikkat çekmektedir (6).

2.5 DÜNYA'DA VE TÜRKİYE'DE KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERALES EPİDEMİYOLOJİSİ

KPC, NDM ve OXA-48 benzeri karbapenemaz enzimleri, *K. pneumoniae* ve *E. coli* başta gelmek üzere Enterobacterales türleri arasında en yaygın karbapenemazlardır (30).

KPC-1 ilk kez 1990'lı yılların sonunda ABD'de bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır (31). KPC üreten *K. pneumoniae* daha sonra İsrail, Yunanistan, İtalya, Kolombiya ve Çin gibi diğer ülkelere yayılım göstermiştir (32). Günümüzde KPC üreten Enterobacterales izolatları Kuzey Amerika, Güney Amerika (Kolombiya, Brezilya, Arjantin, Ekvador), Avrupa (İtalya, Yunanistan, Almanya, Polonya, Portekiz) ve Asya'da (Çin, Güney Kore, Tayvan) endemiktir (23, 33, 34). En yaygın olarak KPC-2 ve KPC-3 görülmekle birlikte, şu anda tanımlanmış 200'den fazla KPC türü bulunmaktadır (25).

NDM-1 karbapenemaz enzimi ilk kez Hindistan'da bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır (35). Hindistan alt kıtasında, Orta Doğu ve Balkanlar'da endemikite göstermekle beraber dünya genelinde görülebilmektedir. Endemik bölgelere yapılan seyahatler NDM üreticilerinin endemik olmayan bölgelerde hastane kaynaklı salgınlara yol açmasına ve küresel yayılımına sebep olmaktadır (36). ABD'de CPE izolatlarında NDM, KPC'den sonra ikinci sırada görülmektedir fakat endemik kategorisinde değildir (37). Şu ana kadar tanımlanmış 60'tan fazla NDM bulunmaktadır ve küresel olarak en yaygın NDM enzimleri NDM-1 ve NDM-5'dir (25).

OXA-48 benzeri karbapenemazlar Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Belçika ile İspanya gibi bazı Avrupa ülkelerinde Enterobacterales türlerinde en sık görülen karbapenemaz tipi olarak saptanmıştır (38).

VIM enzimleri *Enterobacter spp.* türleri arasında en yaygın ve *Citrobacter spp.* türleri arasında ikinci en yaygın karbapenemazdır (39, 40). IMP ise Enterobacterales üyelerinde nadir olarak görülmektedir (30).

Meropenem duyarlı olmayan Enterobacterales'in incelendiği küresel sürveyans çalışmasında (2012-2017), izolatların %47'sinde KPC, %20,6'sında MBL ve %19'unda OXA-48 benzeri karbapenemaz tespit edilmiştir (30). SMART (2008-2014) sürveyans programı verilerine göre CPE izolatlarının %53,2'si KPC, %20'si OXA-48 benzeri, %19,4'ü NDM, %6'sı VIM ve %2,7'si IMP saptanmıştır (41).

Ülkemiz CRE izolatlarının yaygın görüldüğü ve OXA-48 benzeri CPE açısından endemik kategoride sınıflandırılan bir bölgedir. Türkiye'nin farklı bölgelerinden 2014 yılında elde edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında %84,6'lık bir oran ile OXA-48 benzeri baskın karbapenemaz geni olarak bulunmuştur.

İzolaların %2.1'inde OXA-48 benzeri+NDM-1 saptanmıştır (42). İşler ve arkadaşlarının 2018-2019 yıllarında yaptığı çalışmada ise, tek başına OXA-48 benzeri karbapenemazlar baskın karbapenemaz (%75) olarak saptanırken, OXA-48 benzeri+NDM ortak üreticilerinin oranı %16 olarak saptanmıştır (43). Geniş kapsamlı çok merkezli bir sürveyans çalışmasında 2019 yılına ait *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz gen dağılımı incelenmiş, %52,2'sini OXA-48 benzeri, %16,4'ünü KPC, %12,6'sını OXA-48 benzeri ve NDM birlikteliğinin oluşturduğu tespit edilmiştir (44).

2.5.1 Dünya'da ve Türkiye'de OXA-48 Benzeri Karbapenemaz Üreten Enterobacterales Epidemiyolojisi

En yaygın OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantı olan OXA-48, ilk kez 2001 yılında Türkiye'de bir karbapenem dirençli (CR) *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır (3). Günümüzde OXA-48 benzeri CPE izolatları Türkiye, diğer Orta Doğu ülkeleri (Lübnan, Ürdün, Umman, İran ve Suudi Arabistan) ve Kuzey Afrika'da (Fas, Cezayir, Tunus ve Mısır) endemiktir (4, 38). Avrupa ülkelerinde (İspanya, Belçika, Fransa, Hollanda), Avustralya, Meksika, Çin, Tayvan ve Güney Afrika'da OXA-48 enzim üreticileri olan çoğunlukla *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarına bağlı sağlık hizmeti ile ilişkili salgınlar bildirilmiştir (38).

OXA-181, en yaygın ikinci OXA-48 benzeri karbapenemazdır. İlk kez 2006-2007 yılları arasında yapılan SENTRY Antimikrobiyal sürveyans programının bir parçası olarak Hindistan'dan 10 *K. pneumoniae* ve bir *E. cloacae* kompleks izolatında tanımlanmıştır (45). OXA-181 üreticisi Enterobacterales üyeleri 2010'ların ortalarında dünya çapında hızla yayılmıştır ve şu anda OXA-181 üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* Hindistan alt kıtasında endemiktir. Hindistan, Nijerya ve Orta Doğu'ya yapılan seyahatler OXA-181 üreten bakterilerle enfeksiyon için bir risk faktörü olarak tanımlanmıştır (38).

OXA-232 küresel ölçekte üçüncü en sık OXA-48 varyantıdır. İlk kez 2013 yılında Hindistan'ı yakın zamanda ziyaret eden üç Fransız hastadan alınan rektal sürüntülerden elde edilen *E. coli* (bir izolat) ve *K. pneumoniae* 'den (iki izolat) tanımlanmıştır. Hastalardan birinin Hindistan ziyareti sırasında hastaneye yatış öyküsü bulunmaktadır (46). Ardından 2014-2015 yıllarında bildirilen vakalarda Hindistan alt

kıtasına ziyaret ve NDM-1 ile birliktelik dikkat çekmektedir (38). Markovska ve arkadaşları, 2023-2024 yıllarında 20 CR *K. pneumoniae* izolatında %65 oranda OXA-232+NDM-5 birlikteliği tespit etmişlerdir (47).

OXA-244, OXA-48 varyantları arasında nadir görülen bir varyant olup, ilk kez 2011 yılında İspanya'nın Malaga şehrinde bir hastanın asit sıvısından izole edilen *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. Daha sonra Almanya, Rusya, Fransa, Hollanda ve Birleşik Krallık gibi çeşitli ülkelerde de rapor edilmiştir. Fransa kaynaklı bir çalışmada, Mısır ile epidemiyolojik ilişkisi bulunan bir hastada OXA-244 üreten *E. coli* izole edilmiştir. Benzer şekilde, Endonezya seyahati sonrası Hollanda'ya dönen bazı yolcuların da OXA-244 üreten *E. coli* ile kolonize olduğu bildirilmiştir (38).

OXA-162, OXA-48 benzeri karbapenemazlar arasında nadir görülen bir varyant olup, ilk olarak 2008 yılında Türkiye'de izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır (26) 2012 yılından itibaren ise bu varyantın Türkiye'nin yanı sıra Macaristan ve Yunanistan'dan bildirilen *K. pneumoniae* izolatlarında da tespit edildiği raporlanmıştır (38).

CR *K. pneumoniae* izolatlarının değerlendirildiği bir çalışmada, 2014-2018 yıllarında, izolatların %85,5'i OXA-48 ve %3,2'si NDM tespit edilirken, %8,9'unda OXA-48 ve NDM birlikteliği, %2,4'ünde OXA-48 ve VIM birlikteliği tespit edilmiştir (48). 2015-2017 yılları arasında CR *K. pneumoniae* izolatları ile yapılan başka bir çalışmada, OXA-48 baskın karbapenemaz geni olarak saptanmış ve NDM ile yüksek oranda (%26,3) birlikte görüldüğü belirlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada, Türkiye'de ilk kez OXA-48+KPC ve KPC+NDM birlikteliklerinin de görüldüğü tespit edilmiştir (49). 2018-2021 yıllarında izole edilen CR *K. pneumoniae* izolatlarının, %71,3'ünde OXA-48, %16,7'sinde KPC, %4,7'sinde NDM, %6,7'sinde OXA-48+KPC birlikteliği, %0,6'sında OXA-48+NDM birlikteliği saptanmıştır. VIM ve IMP genlerine sahip izolat tespit edilmemiştir (50).

Ülkemizde OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Yapılan bir çalışmada, CR *K. pneumoniae* izolatlarının %45'inde (45/100) OXA-48 benzeri karbapenemaz geni saptanmıştır. OXA-48 varyantları incelediğinde ise, 41 izolatta OXA-48/245, iki izolatta OXA-181 ve iki izolatta OXA-244 tespit edilmiştir (51). Başka bir çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemaz

varyantlarının %51'ini (97/170) OXA-48, %31'ini OXA-232, %11'ini OXA-244 ve %3'ünü OXA-181 oluşturmuştur (43).

2.6 KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERALES TESPİT YÖNTEMLERİ

2.6.1 Karbapenemaz Üretiminin Belirlenmesinin Önemi

Karbapenem dirençli izolatlarda karbapenemaz üretiminin tespiti, enfeksiyon kontrolü ve uygun tedavi yönetiminin yanı sıra, dirençli patojenlerin yayılmasını önlemek ve izlemine sağlamak açısından önem taşımaktadır. Karbapenemaz tespiti, karbapenemaz enzimlerinin türlerine, yaygınlıklarına, küresel dağılımlarına ve zamanla gösterdikleri değişimlere dair önemli bilgiler sunmaktadır. Bu bilgiler, karbapenemaz üreten bakterilerin hem sağlık tesislerinde hem de toplumda hızlı bir şekilde tespit edilmesine ve yayılmalarının kontrol altına alınmasına katkı sağlar.

Yeni beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonlarının kullanıma girmesiyle karbapenemaz varlığının ve türünün belirlenmesi hasta yönetimi kararlarını etkilemesi açısından da daha önemli hale gelmiştir. KPC tespit edilen izolatlarda meropenem-vaborbaktam, seftazidim-avibaktam veya imipenem-relebaktam; OXA-48 benzeri tespit edilen izolatlarda seftazidim-avibaktam öncelikli olarak tercih edilmektedir. MBL enzim üretimi tespit edildiğinde ise seftazidim-avibaktam ile aztreonam kombinasyonu veya sefiderokol tercih edilir (12). Aztreonam-avibaktam, sefepim-taniborbaktam, sefepim-zidebaktam, sefiderokol-kseruborbaktam ve beta-laktamaz inhibitörü nacubaktam gibi yeni beta laktam-beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları hem serin hem de MBL karbapenemazlara karşı aktiviteye sahiptir.

2.6.2 Fenotipik Yöntemler

Karbapenemaz üretiminin tespiti için tarama ve doğrulama testleri kullanılmaktadır. EUCAST tarafından Enterobacterales türlerinde hem ertapenem hem de meropenem için tarama eşik değeri MİK >0,125 µg/mL, disk difüzyon yöntemi ile ise meropenem için <28 mm ve ertapenem için <25 mm olarak belirlenmiştir. Meropenemin en iyi duyarlılık-özgüllük dengesine sahip olduğu belirtilmiştir.

Meropenem 25-27 mm zon çapına sahip iken piperasilin-tazobaktam duyarlı ya da yüksek dozda duyarlı olan izolatlarda taramaya gerek yoktur (14).

SENTRY verileri, karbapenemaz turne bağlı olarak tarama kriterlerinde farklılıklar olduğunu göstermiştir. Tarama kriteri olarak yalnızca meropenem direncine bakıldığında karbapenemaz üreticileri için duyarlılık %84 iken bu oran OXA-48 benzeri üreticiler için %64'e düşmektedir. Duyarlı olmayan ertapenemin kriter olarak alınması, karbapenemaz üreticileri için duyarlılığın %97'ye yükselmesini sağlamıştır (52).

Karbapenemazın varlığını doğrulamak için kombinasyon disk testleri, karbapenem inaktivasyon metodu (CIM), kolorimetrik yöntemler, kültür bazlı yöntemler, MALDI-TOF ve immunokromatografik testler gibi fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Bu testlerin duyarlılığı ve özgüllüğü birbirinden farklı olmakla birlikte, hızlı sonuç veren ve yüksek performans gösteren testlerin seçilmesi enfeksiyon kontrolü ve tedavi yönetimi açısından kritik öneme sahiptir.

2.6.2.1 Kombinasyon disk testleri:

Bu testler, karbapenemaz sınıfları arasında ayırım yapmak için sınıfa özgü bir inhibitör içeren ve içermeyen beta-laktam ajanları test ederek işlev grrleri. Boronik asit türevleri KPC reticilerinin, EDTA ve dipikolinik asit gibi metal şelatörleri MBL'lerin inhibisyonu için kullanılmaktadır. Kloksasilin gibi AmpC inhibitörleri, karbapenemazları yüksek düzeyde AmpC enzimi üreten porin mutasyonlarına sahip izolatlardan ayırt etmek için kullanılır (14).

OXA-48 benzeri enzimler için spesifik inhibitörler henüz mevcut değildir. Temosiline yüksek düzeyde dirençlidirler fakat bu direnç OXA-48 benzeri karbapenemazlara özgü değildir. Diğer inhibitörlerle sinerji yokluğu temosilin direnci ile birleştirildiğinde, OXA-48 benzeri enzimlerin varlığından şüphelenilmelidir (14). Karbapenem, KPC inhibitörlü karbapenem, AmpC inhibitörlü karbapenem, MBL inhibitörlü karbapenem ve temosilin içeren ticari disk kitleri mevcuttur (14, 38).

2.6.2.2 Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM):

Bakteri süspansiyonu ile karbapenemi inkübe ederek, karbapenemin enzim aracılığıyla parçalanması prensibine dayanır. Meropenem diski, bir öze dolusu bakteri ile $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de iki saat inkübe edildikten sonra, *E. coli* ATCC 25922 (meropeneme duyarlı suş) yayılmış Mueller-Hinton besiyerine yerleştirilmektedir. Enzimatik inaktivasyon olduğunda disk etrafında inhibisyon zonu oluşmaz veya çok daralır. Bakteri süspansiyonunun, salin yerine triptik soy broth (TSB) kullanılarak hazırlanması ve inkübasyon süresinin 4 saate çıkarılmasıyla elde edilen modifiye CIM (mCIM), karbapenemaz tespiti için 2017 yılından itibaren CLSI kılavuzunda önerilen fenotipik yöntemdir (53, 54).

Genel olarak uygulanması ve yorumlanması kolay bir yöntemdir. Testin sonuç verme süresini kısaltmak için karbapenem duyarlı suşla 6 saatlik inkübasyon uygulanması, bakterinin karbapenem duyarlı suşun inoküle edildiği MHA plak üzerindeki meropenem diskinin yüzeyine direkt inokülasyonu ya da MBL'yi diğer karbapenemazlardan ayırmak için MBL inhibitörü olan EDTA'nın bakteri solüsyonuna eklenmesi gibi çeşitli ek modifikasyonlar geliştirilmiştir (55–58).

2.6.2.3 Kolorimetrik yöntemler:

Karbapenemaz tespitinde kullanılan kolorimetrik yöntemler, enzimatik aktivite sonucu oluşan renk değişimini gözlemleyerek hızlı ve pratik bir şekilde karbapenemaz varlığını belirlemeye yönelik geliştirilmiş fenotipik testlerdir.

Karba NP testi, karbapenem hidrolizinin pH değişimine yol açması ve bunun sonucunda fenol kırmızısı solüsyonunun kırmızıdan sarıya dönmesi prensibine dayanan hızlı bir testtir (59). CRE izolatlarında iyi performans göstermesine rağmen, OXA-48 benzeri ve GES üreticileri gibi zayıf hidrolitik aktiviteye sahip karbapenemazlarda ve mukoid izolatlarda sorunlar bildirilmiştir (60, 61). Karba NP testinin karbapenemazları tespit etmek ve sınıfını belirlemek üzere geliştirilmiş modifikasyonları (62) ya da farklı ticari yöntemleri de bulunmaktadır (52). Pasteran ve ark.'nın geliştirdiği Karba NP direkt test ile, doğrudan kültürden elde edilmiş saf koloniden hazırlanan, daha basit ve zayıf hidrolitik aktiviteye sahip karbapenemazları tespit etmede daha duyarlı bir protokol geliştirilmiştir (63).

2.6.2.4 Kültür bazlı yöntemler:

Karbapenemaz üreten mikroorganizmaların hastalardaki kolonizasyonunu araştırmak, enfeksiyonun önlenmesi, kontrolü ve sürveyans basamaklarında kültür bazlı yöntemler de yer almaktadır. Kültür bazlı yöntemler, özellikle taşıyıcılığı tespit etmek ve enfeksiyon kontrol önlemlerini zamanında başlatmak açısından büyük önem taşımaktadır. CDC'nin sıvı zenginleştirme yöntemi, direkt karbapenem disk yöntemi ve kromojenik besiyerleri kültür bazlı yöntemlerdir (64). Sıvı zenginleştirme yöntemi, kolonizasyonun tespitinde yüksek duyarlılık sağlarken, sonuç süresi daha uzundur. Direkt karbapenem disk yöntemi ise daha hızlı sonuç vermesine rağmen tarama amaçlı olarak kullanılır. Kromojenik besiyerleri, karbapenem dirençli organizmaları renk farkıyla ayırt etme avantajı sunmakta olup, yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Bu besiyerleri farklı örnek türlerinden karbapenem dirençli organizmaların tespitinde kolaylık sağlar ancak maliyetleri yüksektir. Genel olarak kültür bazlı yöntemler kolay uygulanabilir ve maliyet etkin olmakla birlikte, standardizasyon sorunları mevcuttur (64).

2.6.2.5 Matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi:

Matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS), pik tabanlı yöntem ve hidroliz yöntemi ile karbapenemaz tespitinde kullanılabilir. Pik tabanlı yöntem, karbapenemaz üreten bakterilerde bulunan belirli protein veya peptid işaretleyicileri tespit eder. Özellikle karbapenemaz genlerini taşıyan plazmidlerle ilişkili proteinler, spektrumda karakteristik pikler olarak görülür (52).

Hidroliz yönteminde, bakterinin belli bir süre karbapenem ile inkübasyonu sonrası süpernatant analizi ile, bozulmamış karbapenem (negatif sonuç) ya da hidrolize karbapenemin bir metaboliti (pozitif sonuç) ile ilişkili pikler tanımlanır (65).

2.6.2.6 İmmünokromatografik yöntemler:

İmmünokromatografik lateral akım yöntemleri karbapenemaz üretiminin tespiti ve karbapenemaz türünün tanımlanmasında kullanılan, kısa sürelerde sonuç

verebilen, hızlı ve kolay testlerdir. Karbapenemaz enzimlerine özgü epitoplara yakalanması için monoklonal antikorlarla hassaslaştırılmış nitroselüloz membrana bağlı kolloidal altın nanopartikülleri kullanır (66). Beş ana karbapenemaz ailesini hedefleyecek şekilde (KPC, NDM, VIM, IMP ve OXA-48 benzeri), kültür izolatlarından çalışılarak 15 dakika içinde sonuçlanan testler geliştirilmiştir (67). Moleküler yöntemlere kıyasla, basit, hızlı ve uygun maliyetli alternatiflerdir.

2.6.3 Genotipik Yöntemler:

Genotipik yöntemler, karbapenemaz genlerinin doğrudan tanımlanmasını sağlayan yüksek duyarlılığa sahip moleküler tanı yaklaşımlarıdır. Bu yöntemler arasında polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), dizi analizi ve tüm genom dizileme (Whole Genome Sequencing, WGS) yer alır. İn-house PZR, dizileme ve WGS gibi yöntemler önemli ölçüde moleküler uzmanlık ve ek ekipman gerektirirken, otomatik-ticari moleküler testler, basitleştirilmiş iş akışları ve minimum moleküler uzmanlıkla uygulanabilecek prosedürlere sahiptir (52).

2.6.3.1 Polimeraz zincir reaksiyonu:

Geleneksel bir PZR yöntemi, DNA ekstraksiyonu, PZR amplifikasyonu ve jel elektroforezi adımlarını içermektedir ve sonuç almak genellikle 3-6 saat sürer. Gerçek zamanlı PZR hız ve özgüllük açısından daha üstün, daha az emek gerektiren bir yöntemdir ancak geleneksel PZR'den daha pahalıdır (38). Geleneksel ya da gerçek zamanlı PZR yöntemleri ile hedeflenen genlerin amplifikasyonu sağlanarak varlığı ortaya konur. Ancak, sadece PZR ile varyant ayrımı yapılamaz. Bu amaçla, PZR ürünlerinin ileri moleküler analizlerle sekanslanması gereklidir.

Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP), sabit bir sıcaklık elde etmek için yalnızca bir su banyosu veya ısıtma bloğu gerektiren hızlı, uygun maliyetli, gerçekleştirmesi kolay alternatif bir nükleik asit amplifikasyon metodolojisidir. Sonuçlar çıplak gözle veya UV ışığı ile yorumlanabilir.

Multipleks gerçek zamanlı PZR, genellikle bakteriyel izolatlardan ve bazı testler de doğrudan klinik örnekler üzerinde farklı karbapenemazları aynı anda tanımlamayı amaçlamaktadır. Multipleks gerçek zamanlı PZR avantajları arasında, klinik tanı testleri olarak onaylanmış olmaları, standartlaştırılmış protokoller

içermeleri ve hızlı sonuç elde etmeyi sağlayan pratik kit formatında sunulmaları bulunmaktadır. Bu testler, esas olarak klinik örneklerde karbapenemaz genlerinin doğrudan tespiti amacıyla onaylanmıştır. Nispeten kısa bir sonuç verme süresine sahip olan bu otomatize ticari sistemlerin en önemli dezavantajları ise yüksek maliyetli olmaları ve hedefe yönelik çalıştıkları için yeni gen ve varyantları tespit edememeleridir.

2.6.3.2 Dizi Analizi:

Dizi analizi (sekanslama), amplifiye edilen gen bölgelerinin nükleotid düzeyinde incelenmesini sağlar. Bu yöntemle, OXA-48 benzeri karbapenemaz genlerinde meydana gelen nokta mutasyonları veya küçük varyasyonlar saptanarak farklı varyantların ayırt edilmesi mümkündür. Genellikle "Sanger dizileme" yöntemi bu amaçla kullanılmaktadır.

Sanger dizileme, zincir sonlandırma prensibine dayanan klasik bir yöntemdir ve kısa DNA dizilerinin doğruluğu yüksek bir şekilde analiz edilmesine olanak tanır. Bu yöntemle elde edilen diziler, uluslararası veri tabanlarında (örneğin NCBI BLAST) karşılaştırılarak genetik varyant tayini yapılır.

OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının tespiti için spesifik primerlerle hedef bölge amplifiye edildikten sonra sekanslama yapılır ve elde edilen diziler referanslarla karşılaştırılarak OXA-181, OXA-232, OXA-244 gibi varyantlar tanımlanır.

2.6.3.3 Tüm genom dizileme (WGS):

Tüm genom dizileme çok daha kapsamlı bir yaklaşım olup sadece karbapenemaz genlerini değil, tüm direnç genlerini, virulens faktörlerini ve klonal ilişkileri değerlendirme imkânı sunar. Ancak bu yöntem daha yüksek maliyet, teknik uzmanlık ve ileri biyoinformatik analiz gerektirmektedir (68).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Araştırmamız, prospektif ve tanımlayıcı bir araştırma olarak planlanmıştır. Araştırma tasarımı, "The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology" (STROBE) kılavuzunun bir uyarlaması olan Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO) kılavuzuna göre oluşturulmuştur (69, 70). Uluslararası etik kurallarına uyulmuş ve Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi (SUAM) Klinik Araştırmalar Etik Kurulu 20.08.2024 tarihli 4495 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır. Bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (SBÜ, BAP, Proje Numarası:2025/027) tarafından desteklenmiştir.

3.1 BAKTERİYEL İZOLATLAR

Bu araştırma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına, 2019-2023 tarihleri arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden kültür ile elde edilen ve uygun koşullarda muhafaza edilen CRE izolatlarını kapsamaktadır. Yaş ve cinsiyet ayrımı yapılmaksızın, tüm servis ve polikliniklerden gelen çeşitli hasta örneklerinden elde edilen CRE izolatları incelenmiştir. Aynı hastaya ait farklı klinik örneklerdeki aynı mikroorganizma üremeleri dahil edilmemiştir. Laboratuvarımızda izole edilen CRE sayısı, 2019-2023 yılları arasında 973'tür. Güven aralığı %95 alınarak, %5 hata payı ile her yıl için ayrı ayrı örneklem büyüklükleri hesaplanmıştır. Araştırmaya, %95 güven seviyesini karşılayacak şekilde 703 CRE izolatı dahil edilmiştir.

3.2 BAKTERİ TANIMLANMASI VE DUYARLILIK TESTLERİ

Klinik örneklerden izole edilen CRE izolatlarının tür tanımlaması için, 2019-2020 yıllarında Bruker Biotyper (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Almanya), 2021-2023 yıllarında ise VITEK® MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) MALDI-TOF MS sistemleri kullanılmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri 2019-2020 yılları arasında Phoenix (Becton Dickinson, ABD) ile, 2021-2023 yılları arasında VITEK® 2 COMPACT (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) sistemi ile veya Kirby-Bauer disk

difüzyon yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ampisilin, amoksisilin-klavulanik asit, sefoksitin, seftazidim, seftriakson, sefepim, siprofloksasin, amikasin, gentamisin, piperasilin-tazobaktam, trimetoprim-sulfametaksazol seftazidim-avibaktam, ertapenem, meropenem ve imipenem için antimikrobiyal duyarlılık çalışılmış, en az bir karbapeneme dirençli tespit edilen izolatlar için karbapenem direnci disk difüzyon yöntemi ile doğrulanmış, sonuçlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirilmiştir (71).

Tanımlama ve duyarlılık testleri sonrası CRE izolatları %15 gliserol içeren triptik soy broth besiyerine aktarılarak çalışma tarihine kadar -80°C’de saklanmıştır. Tüm veriler, analiz edilmek üzere Excel dosyasına kaydedilmiştir.

3.3 KARBAPENEMAZ GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Karbapenem dirençli izolatlarda, multipleks gerçek zamanlı PZR yöntemi ile karbapenemaz varlığı araştırılmıştır.

Çalışmaya alınana kadar -80°C’de %15 gliserol içeren triptik soy broth besiyerlerinde muhafaza edilen CRE izolatları, oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra Brilliance UTI Clarity Agar’a (Oxoid, Thermo Fisher Scientific, Kanada) pasajlanmış ve 37°C’de 18-24 saat inkübasyon sonrası saf koloniler elde edilmiştir. Steril mikrotüplere 1 mL steril distile su ve 1 µL öze ile bir öze dolusu bakteri kolonisi eklenmiştir. İzolatların nükleik asit ekstraksiyon işlemi kaynatma yöntemi ile yapılmıştır (72). Bakteri süspansiyonu 95°C’de 10 dakika ısı bloğunda bekletilmiştir. Ardından 12000 rpm’de 3 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen sıvının üst kısmından 5 mikrolitre alınarak üretici önerileri doğrultusunda hazırlanan PZR karışımına eklenmiştir. KPC, NDM, IMP, VIM, OXA-48 benzeri, OXA-23/58 ve OXA-51 karbapenemaz genleri Biospeedy Karbapenem Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye) ile araştırılmıştır. qPZR karışımının içeriği Tablo 1’de gösterilmiştir. Her çalışmada kitin içeriğinde bulunan pozitif ve negatif kontrol de çalışmaya eklenerek değerlendirilmiştir. Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time cihazına yüklenip üretici firmanın oluşturmuş olduğu PZR protokolü uygulanmıştır. qPZR protokolü Tablo 2’de gösterilmiştir. FAM kanalında KPC ve OXA-51, HEX kanalında NDM ve İnternal Kontrol, ROX kanalında VIM ve OXA-23/58, CY5 kanalında ise IMP ve OXA-48 benzeri tespit edilmektedir. RT-PCR cihazına yüklendikten sonra sonuçlar elde edilmiştir.

Tablo 1. qPZR karışımının içeriği

Reaktif	Miktar
2X qPCR Mix	10 µL
Oligo Mix	5 µL
Kalıp nükleik asit/NTC/PC	5 µL
Toplam Reaksiyon Hacmi	20 µL

Tablo 2. qPZR protokolü

Basamak	Döngü sayısı	Sıcaklık	Süre
Enzim aktivasyonu	1 döngü	52°C	3 dk
Bekleme	1 döngü	95°C	10 sn
Denatürasyon		95°C	1 sn
Bağlanma/Uzama	12 Touchdown döngüsü: Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma	67°C-56°C	15 sn
Denatürasyon		95°C	1 sn
Bağlanma/Uzama	30 Döngü	55°C	15 sn
Tespit (okuma)		FAM/HEX/ROX/CY5	

3.4 DİZİ ANALİZİ İLE OXA-48 VARYANTLARININ BELİRLENMESİ

OXA-48 varyantlarının belirlenmesine yönelik dizi analizi, hizmet alımı (Medsantek, İstanbul) ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen Enterobacterales izolatlarında OXA-48 benzeri karbapenemaz gen bölgesi, CDC tarafından önerilen protokoller dikkate alınarak özgül primerler ile çoğaltılmıştır. Bu amaçla kullanılan primer dizileri Tablo 3'de gösterilmiştir.

Tablo 3. Primer dizileri

Primer adı	Dizi (5'-3')	Tm
OXA-48F	TCGCAARAAACCACACATTRTCAT	56°C
OXA-48R	CRGTTGTGCCTGTTTATCAAGAATT	56°C

Bu primerler ile Bio-Rad CFX96 cihazında gerçekleştirilen PZR reaksiyonu için şu protokol kullanılmıştır: 1 döngü 95 derece 30 sn bekleme ve 35 döngü 95 derece 5 sn denatürasyon ile 60 derece 15 sn bağlanma. Amplifikasyon ürünleri %1,5 agaroz jelde %0.5 µg/mL etidyum bromür içeren 1x TBE tamponunda elektroforez edilerek doğrulanmış, yaklaşık 350 bp uzunluğunda spesifik bantlar gözlenmiştir. PZR ürünlerinin saflaştırılması ve kalite kontrolünden sonra sekans aşamasına geçilmiştir.

BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanılarak sekanslama reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı (5 µL toplam hacim):

- 2 µL BigDye Terminator Ready Reaction Mix
- 1.5 µL 5X Sequencing Buffer
- 0.16 µM OXA-48F veya OXA-48R primeri
- 2 µL saflaştırılmış PCR ürünü
- Termal döngü koşulları (GeneAmp PCR System 9700):
- 96°C – 1 dk
- 25 döngü:
- 96°C – 10 sn
- 50°C – 5 sn
- 60°C – 4 dk

5 µL'lik sekans ürünleri deiyonize su ile 20 µL'ye tamamlanmıştır. Üzerine 80 µL %75'lik 2-propanol eklenerek 1 saat karanlık ortamda çöktürülmüştür. Santrifüj sonrası süpernatant uzaklaştırılmış, pellet %75 2-propanol ile yıkanmış ve 90°C'de 1 dakika kurutulmuştur. Ardından pelletler 25 µL Hi-Di™ formamid içinde çözülmüş, -20°C'de saklanmıştır.

Formamid içinde çözülen ürünler 94°C'de 2 dakika denatüre edilmiş ve buz üzerinde soğutulmuştur. Sekanslama, ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems, ABD) cihazında kapiller elektroforez ile gerçekleştirilmiştir. Örnek enjeksiyonu 1.5 kV, 30 saniye süreyle yapılmış; yürütme 15 kV ve 45 dakikada tamamlanmıştır.

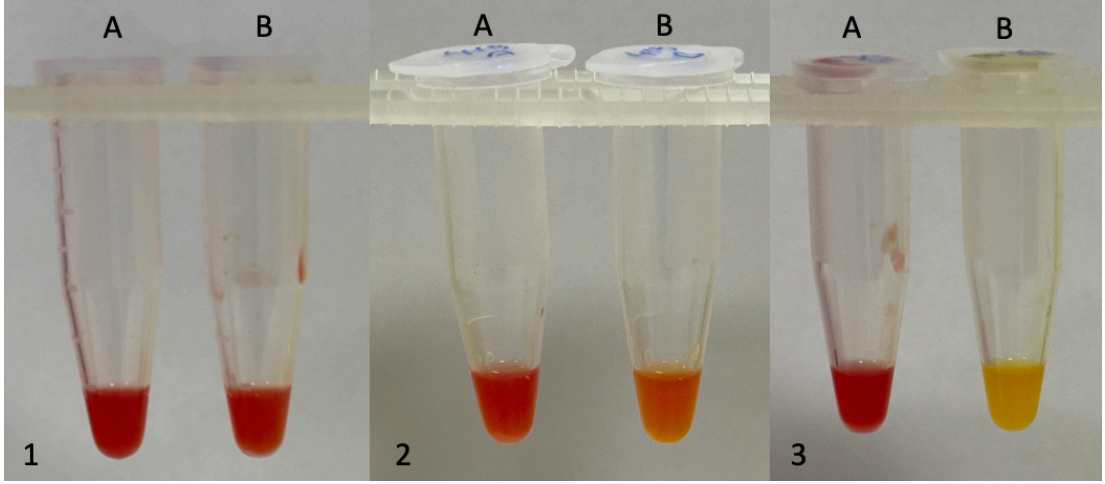
Kapiller elektroforez sonucu elde edilen kromatogramlar ABI Data Collection Software ile toplanmış, Chromas ve SnapGene Viewer programlarıyla değerlendirilmiştir. Kalitesi yeterli diziler FASTA formatına çevrilmiştir. OXA-48 varyant tiplendirmesi için diziler NCBI BLAST aracıyla referans dizilerle hizalanmış, OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-244 gibi varyantlarla uyum gösteren örnekler tanımlanarak veri tabanına kaydedilmiştir.

3.5 FENOTİPİK YÖNTEMLER İLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

3.5.1 Karba NP direkt test (CNPt-direkt)

Moleküler yöntemle OXA-48 benzeri karbapenemaz geni tespit edilen izolatlarda Pasteran ve ark.nın (63) geliştirdiği protokol izlenerek Karba NP direkt yöntemi ile karbapenemaz testi yapılmıştır. Her izolat için 100'er µL A solüsyonu (fenol kırmızısı, çinko sülfat, Triton X-100) ve B solüsyonu (A solüsyonu + 12 mg/mL imipenem-silastatin) hazırlanmıştır. Bir gecelik inkübasyon sonrası besiyerinde üremiş bakteri kolonisinden her iki tüpe de 1 µL öze ile eklenerek vortekslenmiştir. Tüpler 37°C etüvde 2 saatlik inkübasyon süresince her 30 dakikada bir değerlendirilmiştir. Solüsyon A tüpünün herhangi bir renk değişikliği olmadan kırmızı kalması, B tüpünde ise kırmızıdan sarıya renk değişikliği olması durumunda sonuç pozitif olarak, her iki tüpte renk değişikliğinin gözlenmediği durumda ise sonuç negatif olarak değerlendirilmiştir. A tüpünde turuncu/sarı renk değişimi gözlendiğinde test geçersiz kabul edilmiş, B tüpünde kırmızımsı-turuncu renk değişimi gözlendiğinde ise belirsiz olarak değerlendirilmiştir. Karba NP direkt test değerlendirilmesi Şekil 2'de gösterilmiştir.

Her çalışmada karbapenemaz ürettiği bilinen bir izolat pozitif kontrol olarak, karbapenem duyarlı bir izolat negatif kontrol olarak ve ayrıca birer tüp A ve B solüsyonu bakteri inoküle edilmeden kontrol olarak kullanılmıştır.

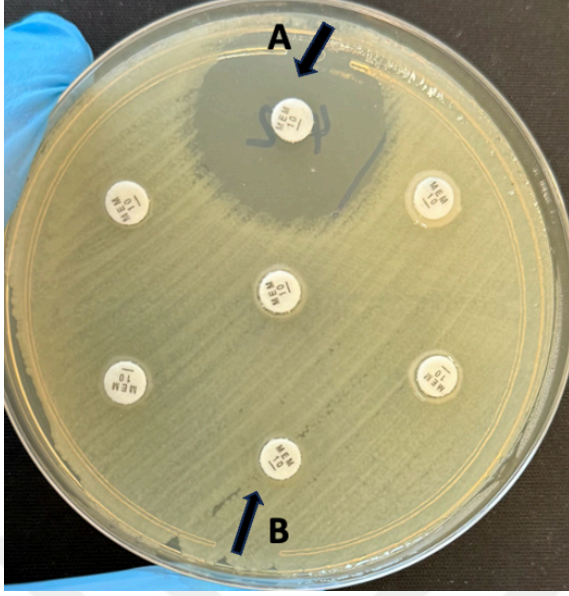


Şekil 2. Karba NP direkt test değerlendirilmesi

(1) Karba NP direkt test negatif, (2) Karba NP direkt test belirsiz, (3) Karba NP direkt test pozitif.

3.5.2 Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM)

Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu CLSI önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (54). Bir gecelik inkübasyon sonrası kanlı agarda üreyen koloniden 1 µL öze ile alınarak 2 mL triptik soy broth ile süspanse edilmiştir. Süspansiyona 10 µg meropenem diski eklenerek 37°C’de 4 saat inkübe edilmiştir. 0.5 McFarland standardına göre ayarlanmış *E. coli* ATCC 25922 (meropeneme duyarlı suş) süspansiyonu Mueller-Hinton agar besiyeri yüzeyinin tamamına steril eküvyon ile yayılmıştır ve 4 saat boyunca bakteri süspansiyonu ile inkübe edilmiş meropenem diski plağa yerleştirilmiştir. 37°C etüvde 18-24 saat inkübasyon sonrası zon çapları ölçülmüştür. CLSI önerilerine göre; 6-15 mm zon çapı ya da zon içerisinde iğne ucu gibi koloniler içeren 16-18 mm zon çapı karbapenemaz pozitif, 19 mm ve üzeri (belirgin zon) zon çapı karbapenemaz negatif, 16-18 mm zon çapı ya da zon içerisinde iğne ucu koloniler içeren 19 mm ve üzeri zon çapı ise belirsiz olarak yorumlanmıştır (54). mCIM değerlendirilmesi Şekil 3’de gösterilmiştir.



Şekil 3. mCIM değerlendirilmesi

(A) mCIM negatif, (B) mCIM pozitif.

3.6 İMİPENEM VE MEROPENEM MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ BELİRLENMESİ

İmipenem ve meropenem antibiyotiklerinin MİK değerleri sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sıvı mikrodilüsyon, ISO standardı 20776-1'e uygun olarak hazırlanmış CLSI M07-A9 önerilerine göre katyon-ayarlı Mueller Hinton Broth (KAMHB) besiyeri kullanılarak çalışılmıştır (73).

Mikrodilüsyon testi 96 kuyucuklu U tabanlı mikroplaklarda yapılmıştır. Bu yöntem; KAMHB besiyerinin hazırlanması, antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması, antibiyotik dilüsyon aralığının hazırlanması, dilüsyon plaklarının hazırlanması, inokülasyonun hazırlanması, inokülasyon, inkübasyon, değerlendirme ve sonuçların yorumlanması basamaklarından oluşmaktadır.

3.6.1 Katyon-ayarlı Mueller Hinton Broth Hazırlanması

22 gr toz KAMHB besiyeri 1 L distile suya eklenmiş ve çözünene kadar karıştırılmıştır. 121°C’de 10 dakika otoklavlanmıştır. Final pH’ı 7,3±0,1 olacak şekilde pH kontrolü yapılmıştır.

3.6.2 Antibiyotik Stok Solüsyonlarının Hazırlanması

Stok solüsyon hazırlamada imipenem monohidrat için çözücü ve dilüe edici olarak kullanılacak olan fosfat tamponu NaH₂PO₄ ve Na₂HPO₄ (pH: 7,2, 0.01 mol/L) ile hazırlanmıştır. Hazırlanan tampon çözeltisi 121°C’de 15 dakika otoklavlanarak steril edilmiştir. Çözelti +4 °C’de muhafaza edilmiştir. Meropenem trihidrat için çözücü ve dilüent olarak steril distile su kullanılmıştır.

Meropenem trihidrat (Sigma Aldrich, ABD) ve imipenem monohidrat (Sigma Aldrich, ABD) antibiyotiklerinin stok solüsyonları aşağıdaki formüle göre hazırlanmıştır.

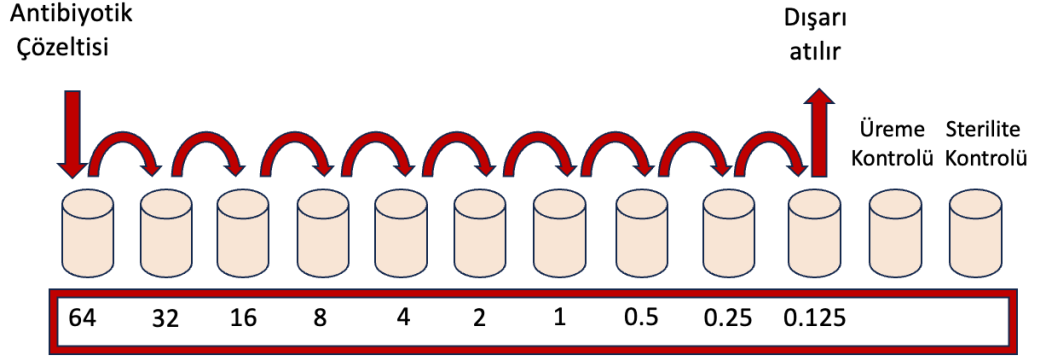
$$Ağırlık (mg) = \frac{Hacim (mL) \times Konsantrasyon (\mu g/mL)}{Potens (\mu g/mL)}$$

Hesaplamalar sonucunda 10 mg meropenem trihidrat 7,65 mL steril distile su ile, 5 mg imipenem monohidrat 3,82 mL fosfat tamponu (pH 7.2, 0.01 mol/L) ile çözülerek 1280 µg/mL konsantrasyonda stok solüsyonu hazırlanmıştır. Meropenem trihidrat stok solüsyonu steril distile su ile, imipenem monohidrat ise fosfat tamponu ile 1:10 oranında dilüe edilerek 128 µg/mL konsantrasyonda antibiyotik solüsyonu elde edilmiştir.

3.6.3 Plakların Hazırlanması

Hazırlanan KAMHB besiyeri, 96 kuyucuklu mikropklara her kuyucuğa 100 µL olacak şekilde dağıtılmıştır. Her izolat için ilk kuyucuğa, 128 µg/mL olarak hazırlanan antibiyotik stok solüsyonundan 100 µL eklenerek pipetaj yapılmıştır. İlk kuyucuktan 100 µL alınarak ikinci kuyucuğa eklenmiş ve bu şekilde seri dilüsyon yapılmıştır. Üreme ve sterilit kontrolü için 11. ve 12. kuyucuğa antibiyotik stok

solüsyonu eklenmemiştir. Antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. Antibiyotik dilüsyonlarının hazırlanması

Meropenem ve imipenem için kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları 64-0,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. *E. coli* ATCC 25922 suşu için EUCAST tarafından meropenem MİK değerleri 0,016-0,03 $\mu\text{g}/\text{mL}$, imipenem MİK değerleri 0,125-0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak kabul edilmektedir (74). *E. coli* ATCC 25922 kontrol suşu için antibiyotik konsantrasyonları 8-0,016 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralıkta hazırlanmıştır. Plaklar hazırlandıktan sonra meropenem sıvı mikrodilüsyon plakları -40°C 'de, imipenem sıvı mikrodilüsyon plakları ise -80°C 'de muhafaza edilmiştir.

3.6.4 İnokülasyon ve İnkübasyon

Kanlı agar besiyerinde 37°C etüvde 18-24 saat inkübasyon sonrası elde edilen saf bakteri kolonilerinden steril serum fizyolojik ile 0.5 Mc Farland bulanıklık ölçüsünde süspansiyon hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyon farklı bir steril tüpte 1:10 oranında serum fizyolojik ile dilüe edilmiştir. Kuyucuklara 5 μL hazırlanan bakteri süspansiyonu eklenerek son bakteri konsantrasyonu 5×10^5 CFU/mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Her kuyucuğa 5 μL bakteri süspansiyonu eklenirken, 12. kuyucuğa sterilite kontrolü nedeniyle eklenmemiştir. Hazırlanan plaklar 37°C 'de 16-20 saat inkübe edilmiştir.

3.6.5 Sonuçların Değerlendirilmesi

İnkübe edilen plaklar 18-20. saatlerde değerlendirilmiştir. EUCAST önerileri doğrultusunda, çıplak gözle, mikroorganizmanın üremesini tamamen engelleyen (%100 inhibisyon) en düşük antimikrobiyal konsantrasyon MİK değeri olarak belirlenmiştir (75). Her izolat için üreme ve sterilite kontrol kuyucukları ve testin kontrolü için *Escherichia coli* ATCC® 25922 kontrol suşunun MİK değerinin beklenen aralıkta olup olmadığı değerlendirilmiştir. Sonuçların yorumlanmasında EUCAST klinik sınır değerleri kullanılmıştır (Tablo 4).

Tablo 4. EUCAST Enterobacterales karbapenem klinik sınır değerleri

KARBAPENEMLER	MİK DEĞERİ		ZON ÇAPI	
	S≤	R>	S≥	R<
İmipenem , <i>Enterobacterales</i> , <i>Morganellaceae</i> hariç	2	4	22	19
İmipenem , <i>Morganellaceae</i>	0.001	4	50	19
Meropenem (menenjit dışı)	2	8	22	16
Meropenem (menenjit)	2	2	22	22

S, duyarlı; R, dirençli.

3.7 İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için SPSS v15.0 (IBM, Armonk, NY) programı kullanılmıştır. Tanımlayıcı istatistikler; kategorik değişkenler için sayı ve yüzde, sayısal değişkenler için normal dağılım koşulu sağlanmadığından median, çeyrekler arası aralık olarak verilmiştir. Sayısal değişkenlerin karşılaştırmaları bağımsız iki grupta Mann Whitney U Testi ile ikiden çok grupta Kruskal Wallis testi ile yapılmıştır. Gruplarda oranlar Ki-kare testi ile karşılaştırılmıştır. Alfa anlamlılık seviyesi $p < 0,05$ olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

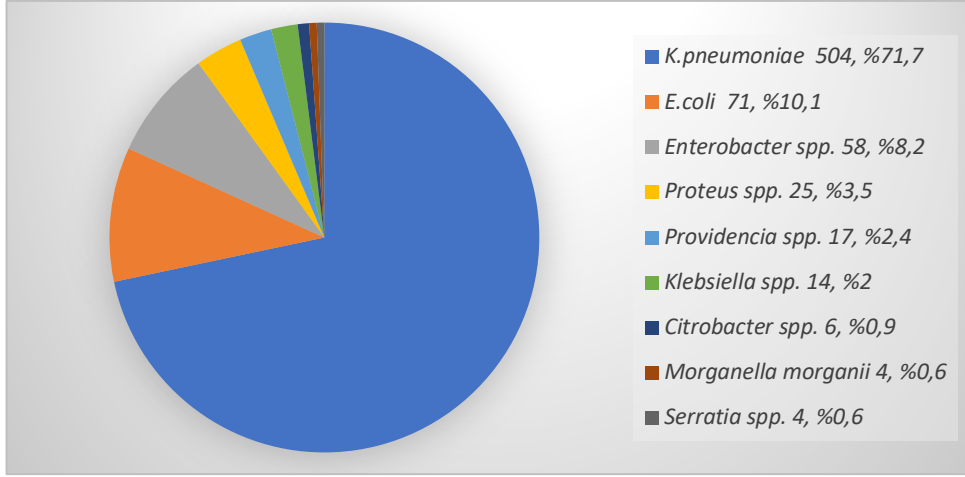
Bu çalışmaya, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na, 2019-2023 yılları arasında gönderilen çeşitli klinik örneklerden [idrar örnekleri (n:190), solunum yolu örnekleri (n:107), yumuşak doku örnekleri (n:60) ve steril vücut sıvısı örnekleri (n:11)] ile elde edilen 703 CRE izolatı dahil edilmiştir. 2019-2023 tarihlerinde Enterobacterales izolatlarında karbapenem direnç oranları Tablo 5'de gösterilmiştir.

Tablo 5. Yıllara göre Enterobacterales izolatlarında karbapenem direnç oranları (%)

	2019	2020	2021	2022	2023
Enterobacterales	%4,3	%7,9	%7	%8,3	%7,8
<i>K. pneumoniae</i>	%10,8	%22,8,	%23,1	%26,3	%25
<i>E. coli</i>	%1,2	%2	%1	%1,6	%1,5

4.1 KARBAPENEM DİRENÇLİ ENTEROBACTERALES İZOLATLARININ TÜR DAĞILIMI

Çalışmaya dahil edilen CRE izolatlarının tür dağılımı incelendiğinde, en sık tespit edilen tür %71,7 (504/703) oranıyla *K. pneumoniae* olmuştur. Bunu sırasıyla %10,1 (71/703) ile *E. coli* ve %8,2 (58/703) ile *Enterobacter spp.* takip etmiştir. İzolatların tür dağılımı Şekil 5'de gösterilmiştir.



Şekil 5. CRE izolatlarının tür dağılımı

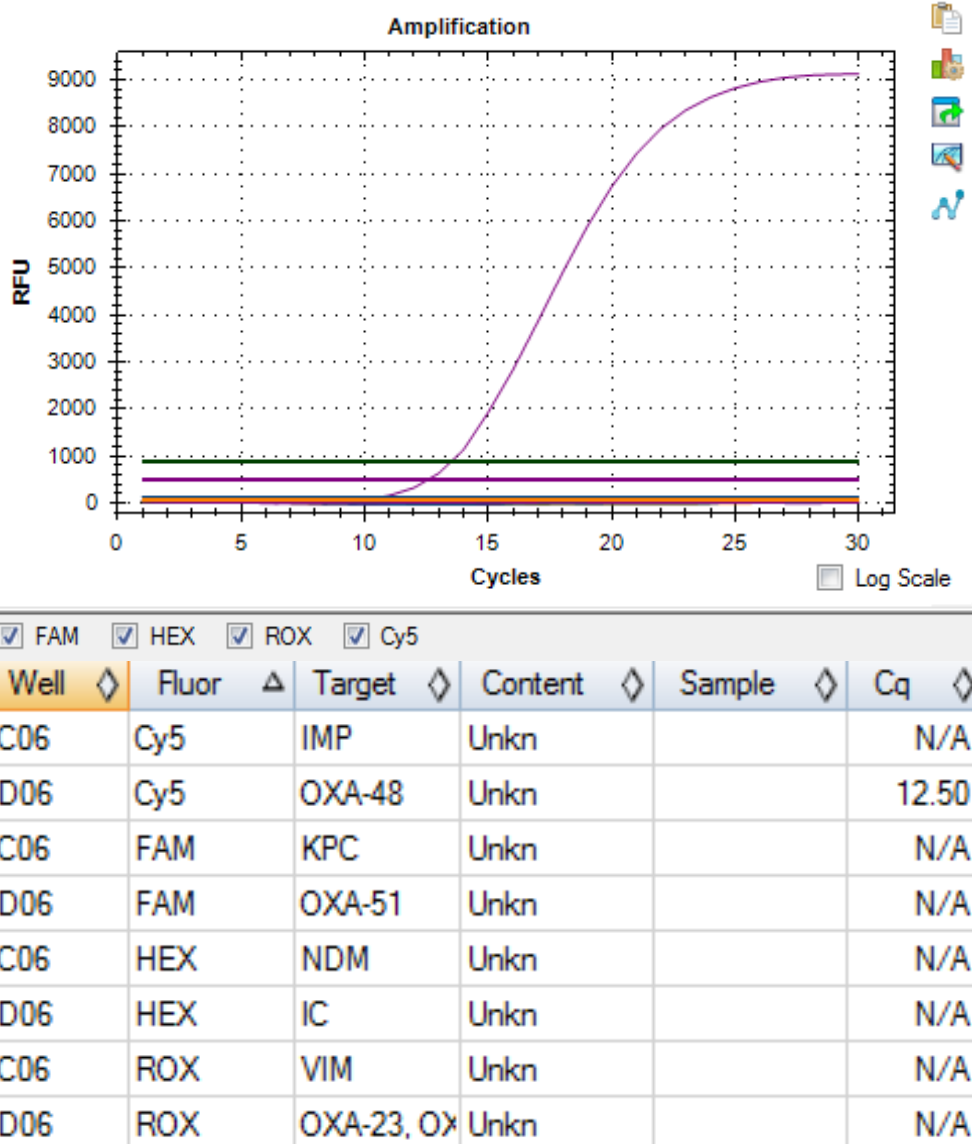
4.2 KARBAPENEMAZ GENLERİNİN TESPİTİNE İLİŞKİN BULGULAR

Multipleks gerçek zamanlı PZR ile karbapenemaz geni araştırılan 703 CRE izolatının, %52,3'ünde (368/703) OXA-48 benzeri karbapenemaz geni tespit edilmiştir. İzolatların %17,2'sinde (121/703) NDM ve %12'sinde (85/703) KPC karbapenemaz geni saptanmıştır. İzolatların 167'sinde hedeflenen karbapenemaz genlerinden hiçbiri tespit edilememiştir. Karbapenemaz geni tespit edilen izolatların karbapenemaz türlerine göre dağılımı Tablo 6'da gösterilmiştir.

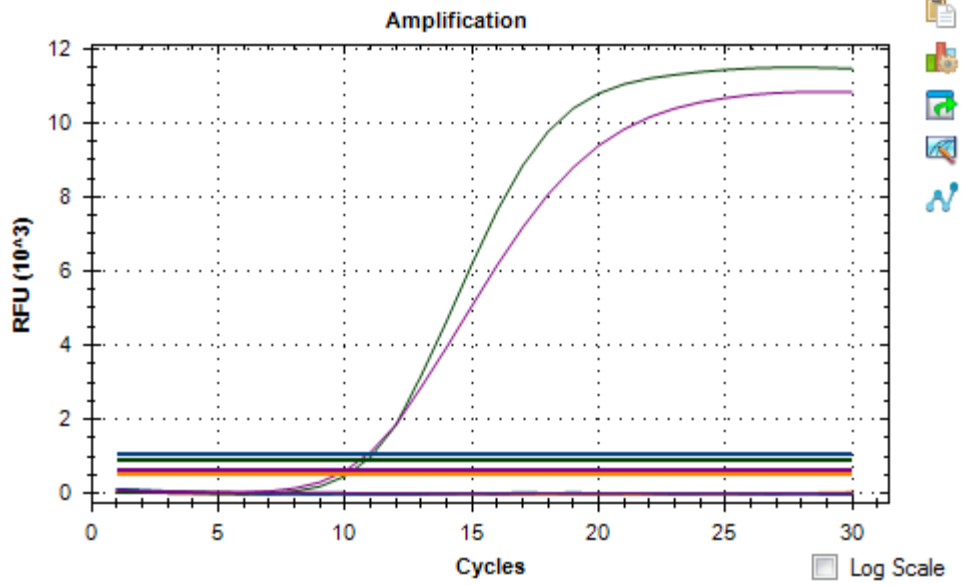
Tablo 6. Çalışma izolatlarının karbapenemaz türlerine göre dağılımı

Karbapenemaz genleri	n
OXA-48 benzeri	325
NDM	82
KPC	81
OXA-48 benzeri+NDM	38
OXA-48 benzeri+KPC	4
VIM	4
OXA-48 benzeri+VIM	1
NDM+OXA-23/58	1
TOPLAM	536

OXA-48 benzeri karbapenemaz geni saptanan 368 izolatın 38'inde (%10,3) NDM ile, dördünde (%1) KPC ile ve birinde VIM ile birlikte saptanmıştır. Tespit edilen karbapenemaz genlerine ilişkin amplifikasyon eğrisi örnekleri Şekil 6 ve Şekil 7'de gösterilmiştir.



Şekil 6. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni amplifikasyon eğrisi

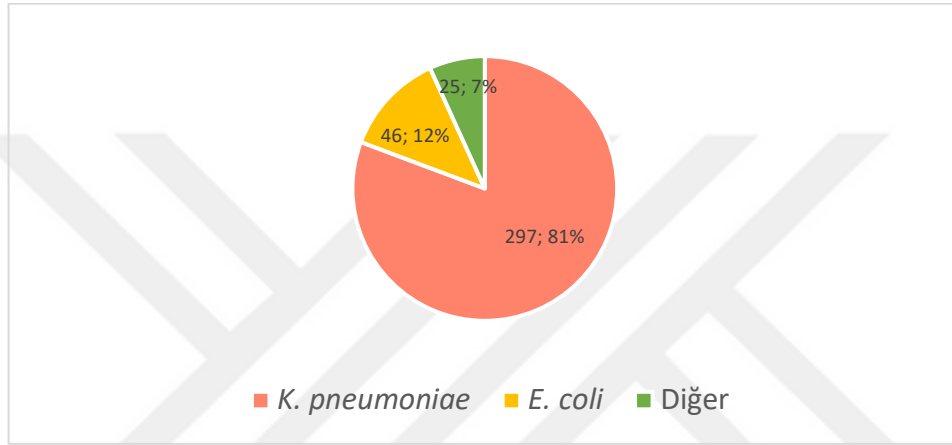


Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
E04	Cy5	IMP	Unkn		N/A
F04	Cy5	OXA-48	Unkn		10.07
E04	FAM	KPC	Unkn		N/A
F04	FAM	OXA-51	Unkn		N/A
E04	HEX	NDM	Unkn		10.81
F04	HEX	IC	Unkn		N/A
E04	ROX	VIM	Unkn		N/A
F04	ROX	OXA-23, OX	Unkn		N/A

Şekil 7. OXA-48 benzeri ve NDM karbapenemaz genleri amplifikasyon eğrisi

4.3 OXA-48 BENZERİ KARBAPENEMAZ POZİTİF İZOLATLARIN DAĞILIMI

OXA-48 benzeri karbapenemaz geni tespit edilen 368 izolatin tür dağılımı incelendiğinde, en sık *K. pneumoniae* (n:297, %80,7) saptanırken, onu *E. coli*'nin (n:46, %12,5) takip ettiği görülmüştür. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni pozitif izolatların tür dağılımı Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil 8. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni pozitif izolatların (n:368) tür dağılımı

(Diğer: *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *C. braakii*, *C. koseri*, *S. marcescens*)

Bakteri türlerine göre tek başına ve ikili OXA-48 benzeri karbapenemaz dağılımları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Pearson Ki-kare, $p=0,017$). *E. coli* izolatlarının tamamında yalnızca OXA-48 benzeri karbapenemaz tespit edilirken, *K. pneumoniae* izolatlarının 38'inde (%12,8) (34 OXA-48 benzeri+NDM, dört OXA-48 benzeri+KPC) ve diğer Enterobacterales türlerinin beşinde (%20) OXA-48 benzeri karbapenemazın başka karbapenemaz türleriyle birlikte bulunduğu gözlemlenmiştir.

Tek başına ve ikili OXA-48 benzeri karbapenemazların yıllara göre dağılımları Tablo 7'de sunulmakta olup bu oranlarda istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,172$).

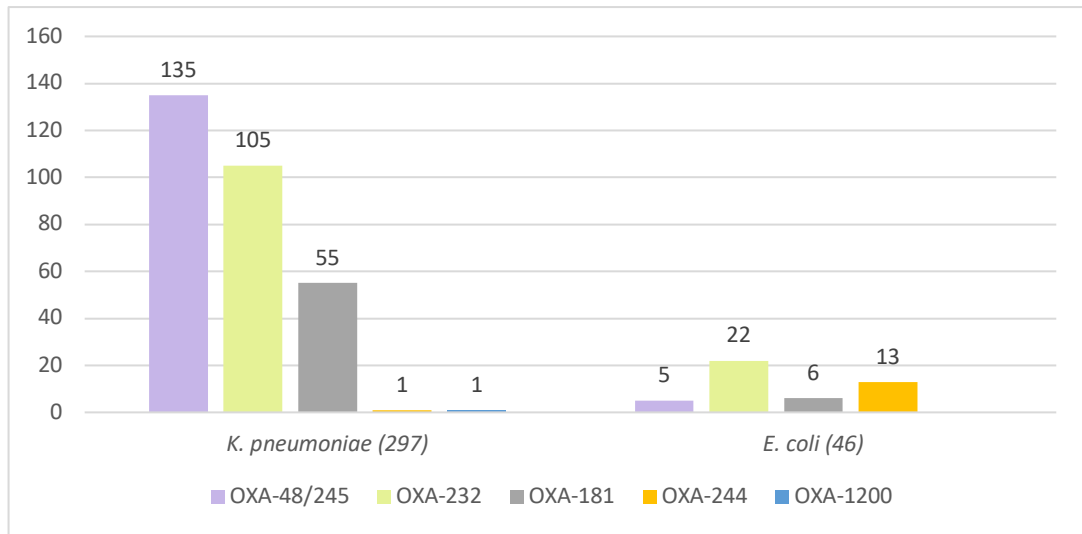
Tablo 7. Tek başına ve ikili OXA-48 benzeri karbapenemazların yıllara göre dağılımı

	OXA-48 benzeri	OXA-48 benzeri + NDM	OXA-48 benzeri + KPC	OXA-48 benzeri + VIM	Toplam
2019	31	4	-	-	35
2020	40	3	-	-	43
2021	53	3	-	-	56
2022	88	10	-	-	98
2023	113	18	4	1	136
Toplam	325	38	4	1	368

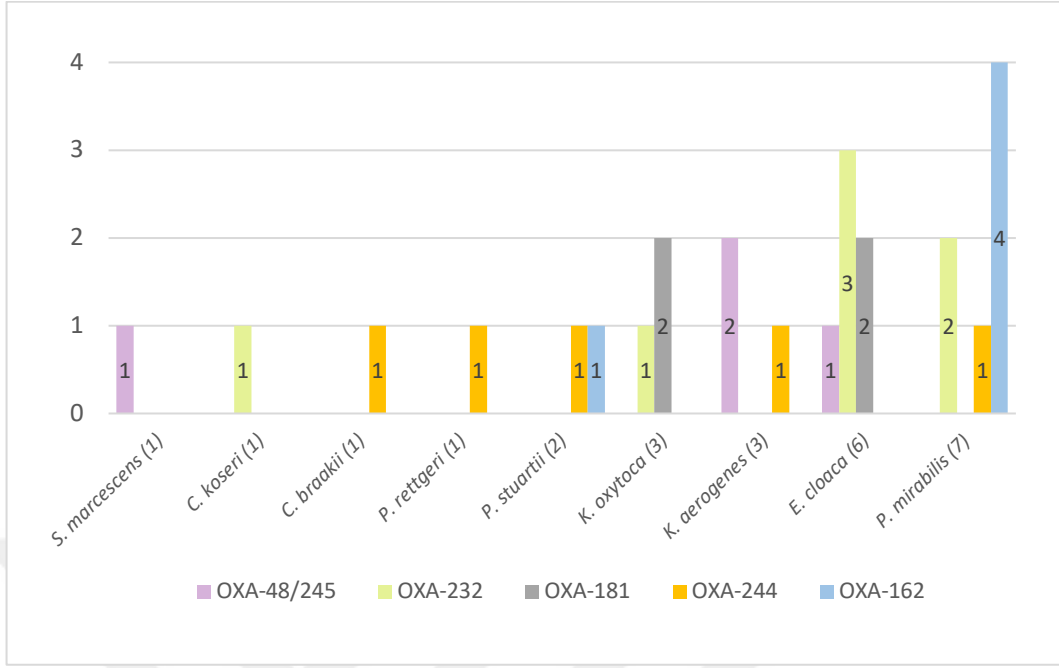
4.4 OXA-48 VARYANTLARINA İLİŞKİN BULGULAR

OXA-48 benzeri karbapenemazı olan izolatların 144'ünde (%39,1) OXA-48/245, 134'ünde (%36,4) OXA-232, 65'inde (%17,6) OXA-181, 19'unda (%5,1) OXA-244, beşinde (%1,3) OXA-162 ve birinde (%0,2) OXA-1200 tespit edilmiştir.

Varyantların Enterobacterales türlerine göre dağılımı Şekil 9 ve Şekil 10'da gösterilmiştir. Bakteri türüne göre varyantların dağılımında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,001$). *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48/245 ve OXA-232 varyantları baskın olarak görülürken, *E. coli* izolatlarında en yaygın varyant OXA-232 olmuştur. OXA-162, dördü *P. mirabilis* olmak üzere beş izolatta tespit edilmiştir.



Şekil 9. *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında OXA-48 varyantlarının dağılımı



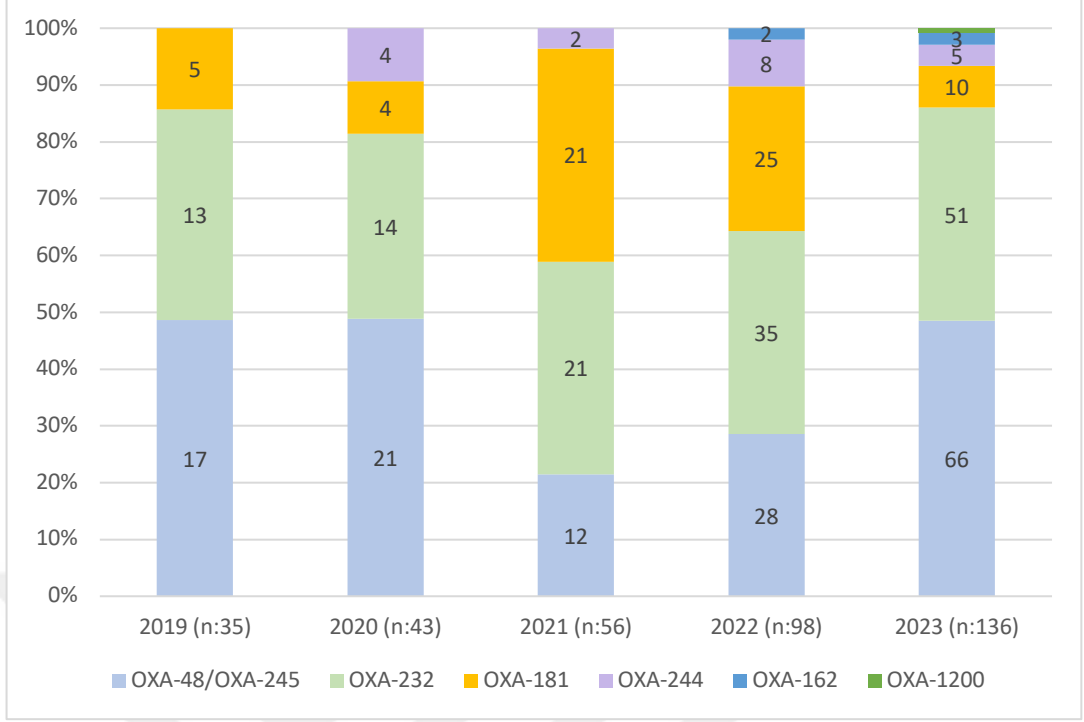
Şekil 10. Diğer Enterobacterales türlerinde OXA-48 varyantlarının dağılımı

OXA-48 varyantlarının tek ve ikili karbapenemaz üretimine göre dağılımı Tablo 8’de gösterilmiştir. Varyantların tek veya ikili karbapenemaz üretimi arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Fisher–Freeman–Halton Exact Test, $p=0,015$). İkili karbapenemaz üreticisi olan izolatlarda OXA-48/245 varyantı diğer varyantlara göre yüksek oranda saptanırken, OXA-181 ve OXA-232 oranları ise daha düşük tespit edilmiştir. 24 izolatta OXA-48/245+NDM, dokuz izolatta OXA-232+NDM, dört izolatta OXA-48/245+KPC, üç izolatta OXA-181+NDM, iki izolatta OXA-244+NDM ve bir izolatta OXA-181+VIM tespit edilmiştir.

Tablo 8. OXA-48 varyantlarının tek ve ikili karbapenemaz üretimine göre dağılımı

Varyantlar	Karbapenemaz Genleri				Toplam
	İkili karbapenemaz			Tekli karbapenemaz	
	OXA-48 benzeri+NDM	OXA-48 benzeri+KPC	OXA-48 benzeri+VIM	OXA-48 benzeri	
OXA-48/245	24	4	-	116	144
OXA-232	9	-	-	125	134
OXA-181	3	-	1	61	65
OXA-244	2	-	-	17	19
OXA-162	-	-	-	5	5
OXA1200	-	-	-	1	1
Toplam	38	4	1	325	368

OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının 2019-2023 tarihleri arasında dağılımları incelenmiş ve varyantların yıllara göre dağılımında anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p<0,001$). 2021-2022 yıllarında OXA-181 varyantı diğer yıllara göre daha yüksek oranda saptanırken, aynı yıllarda OXA-48/245 varyantı diğer yıllara göre daha düşük oranda tespit edilmiştir. Varyantların yıllara göre dağılımı Şekil 11’de gösterilmiştir.



Şekil 11. OXA-48 varyantlarının yıllara göre dağılımı

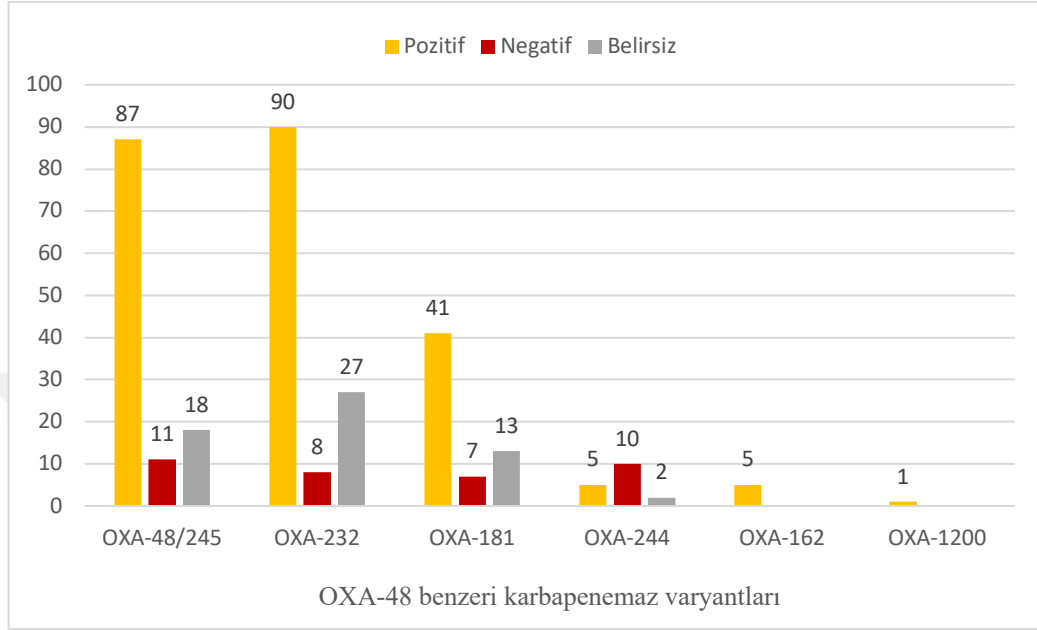
4.5 FENOTİPİK KARBAPENEMAZ TESPİTİNE İLİŞKİN

BULGULAR

4.5.1 Karba NP Direkt Test Sonuçları

OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif 368 izolatta Karba NP direkt test yöntemi ile karbapenemaz varlığı araştırılmıştır. Karba NP direkt test 272 izolatta (%73,9) pozitif, 36 izolatta (%9,8) negatif ve 60 izolatta (%16,3) belirsiz olarak değerlendirilmiştir. Tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinin varyantlara göre Karba NP direkt test sonuçları Şekil 12’de gösterilmiştir. Karba NP direkt test sonuçlarında varyantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,001$). Karba NP direkt test pozitif izolatlarda OXA-48/245 ve OXA-232 varyant oranı yüksek saptanırken, Karba NP direkt test belirsiz izolatlarda OXA-232 varyant oranı, Karba NP direkt test negatif izolatlarda ise OXA-244 varyant oranı yüksek saptanmıştır.

İkili karbapenemaz üreticilerinin tamamı (n:43) Karba NP direkt test ile pozitif bulunmuştur.



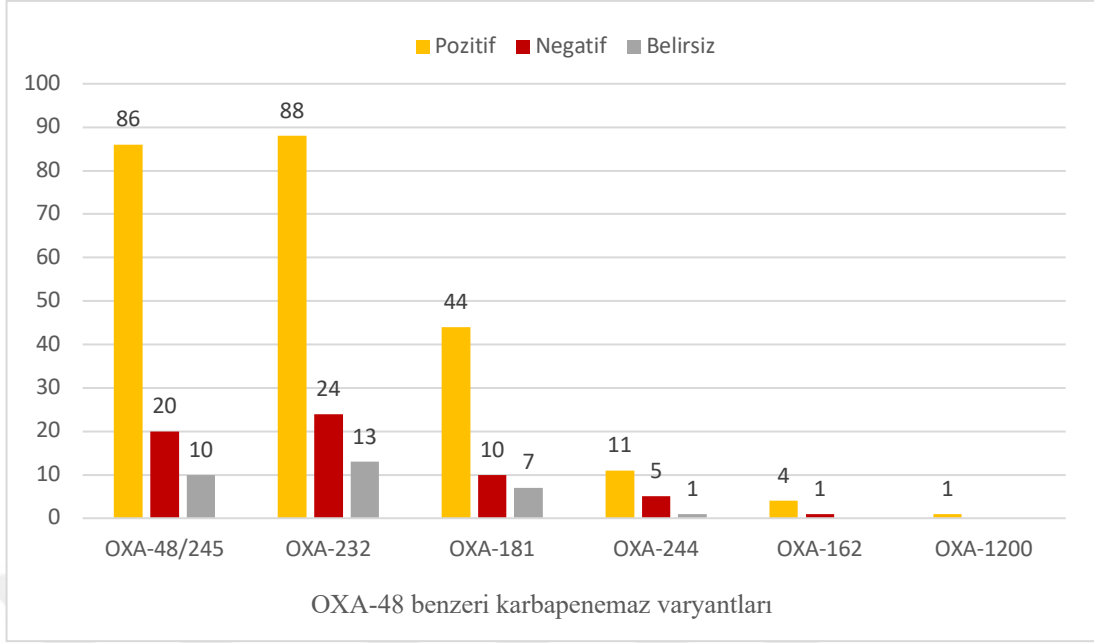
Şekil 12. OXA-48 varyantlarına göre Karba NP direkt test sonuçları

(İkili karbapenemaz üreticileri dahil edilmemiştir.)

4.5.2 Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu Sonuçları

OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif 368 izolatta mCIM ile karbapenemaz varlığı araştırılmıştır, test sonucu izolatların 274'ünde (%74,4) pozitif, 61'inde (%16,6) negatif, 33'ünde (%9) ise belirsiz olarak değerlendirilmiştir. Varyantlara göre mCIM sonuçları Şekil 13'de gösterilmiştir. Varyantlara göre mCIM sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır ($p=0,970$).

İkili karbapenemaz üreticilerinin %93'ü (40/43) mCIM ile pozitif bulunmuştur.



Şekil 13. OXA-48 varyantlarına göre mCIM sonuçları

[İkili karbapenemaz üreticileri dahil edilmemiştir.]

OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarına göre Karba NP direkt test ile mCIM arasındaki uyum değerlendirilmiştir ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p < 0,001$). Karba NP ile mCIM uyumlu olmayan izolatlarda en sık görülen varyant OXA-232 iken, uyumlu izolatlarda en sık OXA-48/245 tespit edilmiştir.

4.6 OXA-48 VARYANTLARININ ANTİMİKROBİYAL DUYARLILIKLARINA İLİŞKİN BULGULAR

OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif Enterobacterales izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 9’da ve OXA-48 varyantlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 9. OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif Enterobacterales izolatlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antimikrobiyal	<i>K. pneumoniae</i> (n:297)	<i>E. coli</i> (n:46)	Diğer (n:25)	Tüm Enterobacterales (n:368)
	%S	%S	%S	%S
Amikasin	25	97,8	68	37
Ampisilin	0	0	0	0
Amoksisilin-klavunat	0	0	0	0
Sefepim	3,7	15,2	12	5,7
Sefoksitin	6,7	21,7	8	8,7
Seftazidim	3,7	8,7	12	4,9
Siprofloksasin	5,7	34,8	40	11,7
Seftazidim-avibaktam	88,5	100	80	89,4
Seftriakson	3,3	15,2	12	5,4
Ertapenem	0	0	0	0
Gentamisin	31,3	91,3	52	40,2
Meropenem	17,5	100	64	31
Piperasilin-tazobaktam	0	0	0	0
Trimetoprim-sulfametaksazol	20,2	41,3	52	25
İmipenem	29,6	97,8	44	39,1

S, duyarlı; Diğer, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *C. braakii*, *C. koseri*, *S. marcescens*.

Tablo 10. OXA-48 varyantlarının antimikrobiyal duyarlılık sonuçları

Antimikrobiyal	OXA-48/245	OXA-232	OXA-181	OXA-244	OXA-162	OXA-1200	TOPLAM
	(n:144)	(n:134)	(n:65)	(n:19)	(n:5)	(n:1)	(n:368)
	%S	%S	%S	%S	%S	%S	%S
Amikasin	37,5	35,1	24,6	89,5	40	0	37
Ampisilin	0	0	0	0	0	0	0
Amoksisilin-klavulanik asit	0	0	0	0	0	0	0
Sefepim	6,9	4,5	3,1	15,8	0	0	5,7
Sefoksitin	11,1	6,7	7,7	10,5	0	0	8,7
Seftazidim	6,9	3,7	3,1	5,3	0	0	4,9
Siprofloksasin	11,1	9,7	7,7	47,4	0	0	11,7
Seftazidim-avibaktam	83,3	93,3	93,8	89,5	100	100	89,4
Seftriakson	6,3	4,5	3,1	15,8	0	0	5,4
Ertapenem	0	0	0	0	0	0	0
Gentamisin	45,8	33,6	30,8	78,9	20	100	40,2
Meropenem	28,5	29,9	21,5	84,2	60	0	31
Piperasilin-tazobaktam	0	0	0	0	0	0	0
Trimetoprim-sulfametaksazol	29,2	20,1	20	42,1	40	0	25
İmipenem	34	44	30,8	84,2	0	0	39,1

S, duyarlı.

İzolatların %92,1'i (339/368) GSBL üreticisidir. Test edilen antibiyotiklerden amikasin, siprofloksasin ve gentamisin duyarlılıkları varyantlara göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermiştir ($p < 0,001$; $p = 0,005$; $p < 0,001$). OXA-244 varyantı, bu antibiyotiklere karşı diğer varyantlara kıyasla daha yüksek duyarlılık göstermiştir.

İzolatların %89,4'ü seftazidim-avibaktama duyarlı bulunmuştur. Tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların tamamı seftazidim-avibaktama duyarlıyken, MBL ile birlikte üretim tespit edilen tüm izolatlar dirençli olarak saptanmıştır.

Varyantlara göre tek ve ikili karbapenemaz üreticilerinin meropenem ve imipenem duyarlılıkları Tablo 11'de gösterilmiştir.

Tablo 11. Varyantlara göre tek ve ikili karbapenemaz üreticilerinin meropenem ve imipenem duyarlılıkları

Varyantlar	Karbapenemaz			
	Tek (n:325)		İkili (n:43)	
	MEM %S	IPM %S	MEM %S	IPM %S
OXA-48/245	35,3	40,5	0	7,1
OXA-232	32	47,2	0	0
OXA-181	22,9	32,8	0	0
OXA-244	94,1	94,1	0	0
OXA-162	60	0	-	-
OXA-1200	0	0	-	-
Toplam	35,1	43,7	0	4,6

MEM, meropenem; IMP, imipenem

Tek: Tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticisi. İkili: İkili karbapenemaz üreticisi (OXA-48 benzeri+NDM, OXA-48 benzeri+KPC, OXA-48 benzeri+VIM)

OXA-48 varyantlarına göre *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları Tablo 12’de gösterilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında varyantlara göre meropenem ve imipenem duyarlılıklarında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Fisher-Freeman-Halton Exact Test, $p=0,031$, $p=0,005$). OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 varyantlarında meropeneme direnç oranı yüksek saptanmıştır.

Tablo 12. OXA-48 varyantlarına göre *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları

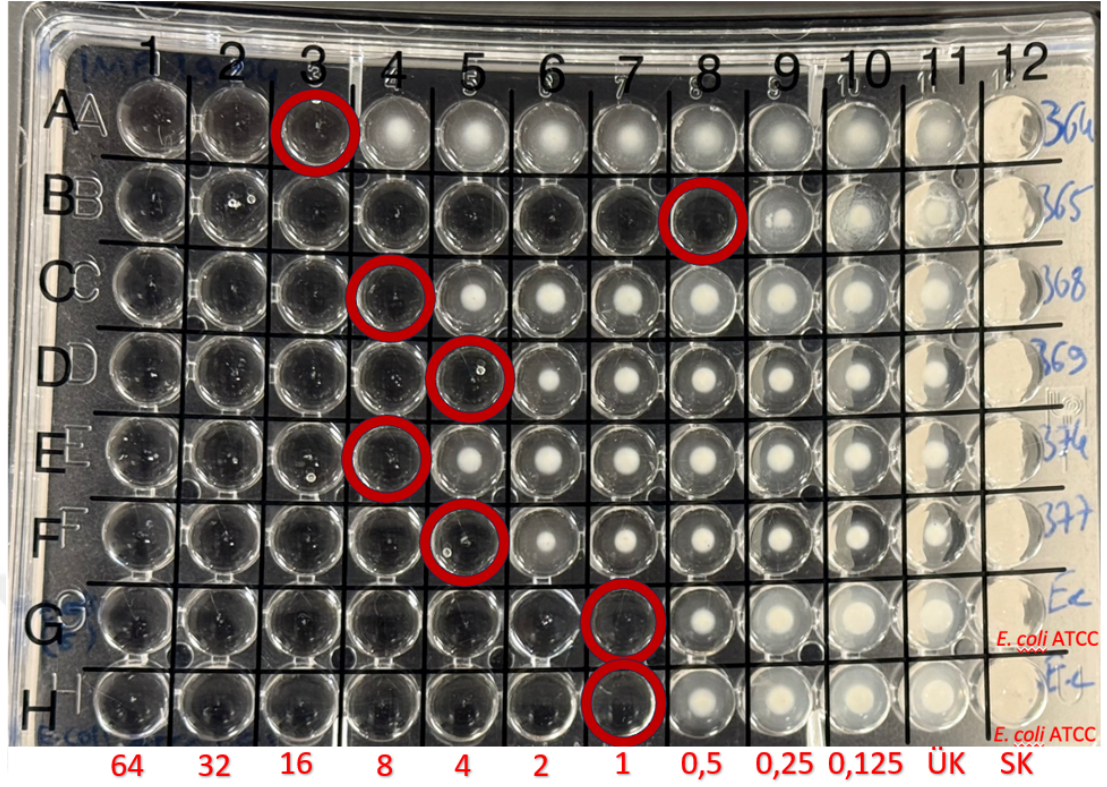
OXA-48 varyantları	<i>K. pneumoniae</i> (n:297)				<i>E. coli</i> (n:46)			
	n (%S)				n (%S)			
	n	MEM	IPM	MEM ve IPM	n	MEM	IPM	MEM ve IPM
OXA-48/245	135	32 (23,7)	41 (30,4)	27 (20)	5	5 (100)	5 (100)	5 (100)
OXA-232	105	13 (12,4)	34 (32,4)	13 (12,4)	22	22 (100)	21 (95,5)	21 (95,5)
OXA-181	55	6 (10,9)	12 (21,8)	6 (10,9)	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)
OXA-244	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)	13	13 (100)	13 (100)	13 (100)
OXA-162	-	-	-	-	-	-	-	-
OXA-1200	1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	-	-	-	-

MEM, meropenem; IPM, imipenem; S, duyarlı.

4.7 KARBAPENEM GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYON DEĞERLERİNE İLİŞKİN BULGULAR

Sıvı mikrodilüsyon testi sonuçlarına göre izolatların %31'i (114/368) meropeneme, %39,1'i (144/368) imipeneme duyarlı iken %28'i (103/368) hem meropeneme hem imipeneme duyarlı bulunmuştur. Temsili MİK sonuçları Şekil 14'de gösterilmiştir.

Meropenem ve imipenem MİK değerleri varyantlar arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (Kruskal Wallis, $p<0,001$, $p<0,001$). OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 varyantlarının meropenem MİK değerleri OXA-244 varyantına göre yüksek bulunmuştur (hepsi için $p<0,001$). OXA-232, OXA-181, OXA-48/245, OXA-162 varyantlarının imipenem MİK değerleri OXA-244 varyantına göre yüksek bulunmuştur ($p=0,011$, $p=0,007$, $p<0,001$, $p=0,012$). OXA-48 varyantlarının meropenem ve imipenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 13'de gösterilmiştir.

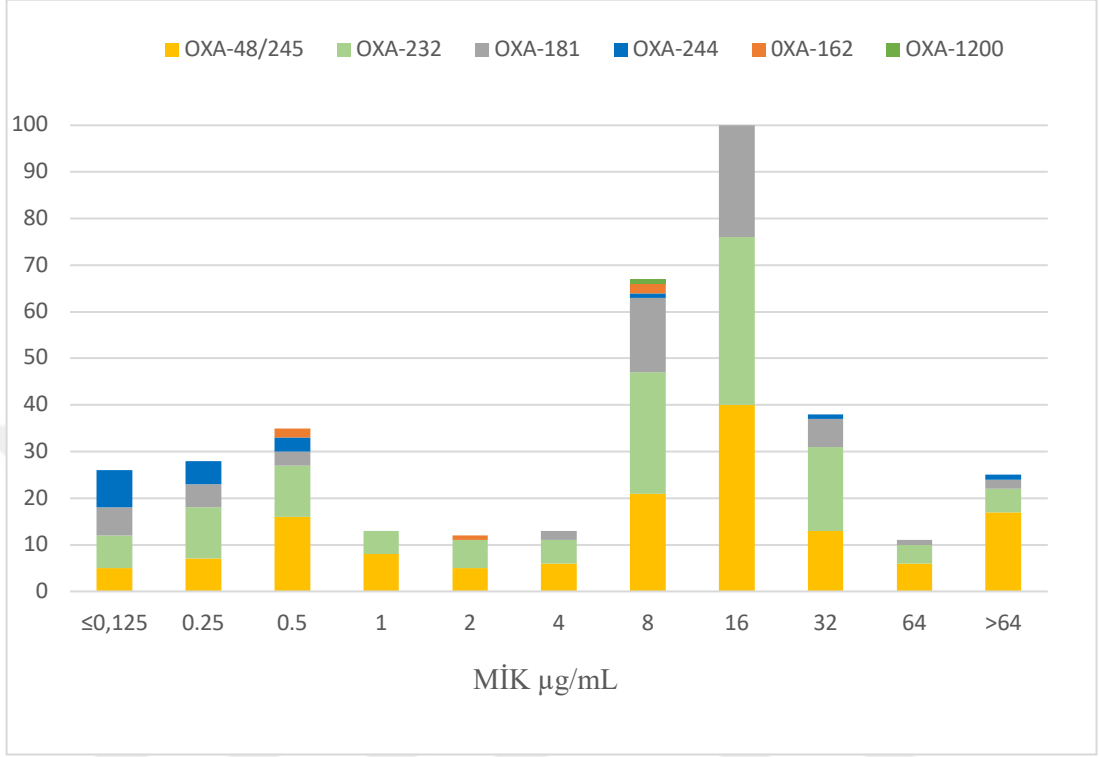


Şekil 14. Sıvı mikrodilüsyon plağında temsili MİK sonuçları

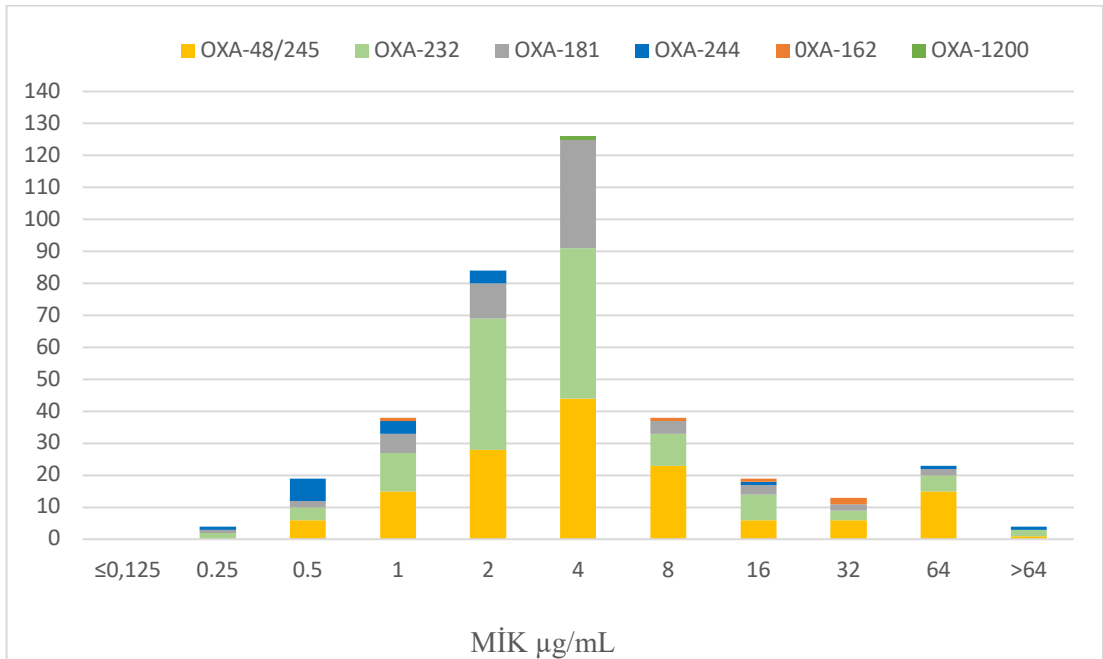
Tablo 13. OXA-48 varyantlarının meropenem ve imipenem MİK₅₀-MİK₉₀ değerleri

Varyantlar	Meropenem			İmipenem		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK dağılımı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK dağılımı
OXA-1200	8	8	8-8	4	4	4-4
OXA-162	2	8	0,5-8	16	32	1-32
OXA-181	16	32	≤0,125->64	4	16	0,25-64
OXA-232	8	32	≤0,125->64	4	16	0,25->64
OXA-244	0,25	32	≤0,125->64	1	64	0,25->64
OXA-48/245	16	>64	≤0,125->64	4	64	0,5->64

Varyantlara göre meropenem ve imipenem MİK dağılımları Şekil 15 ve Şekil 16'da gösterilmiştir.



Şekil 15. OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı



Şekil 16. OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı

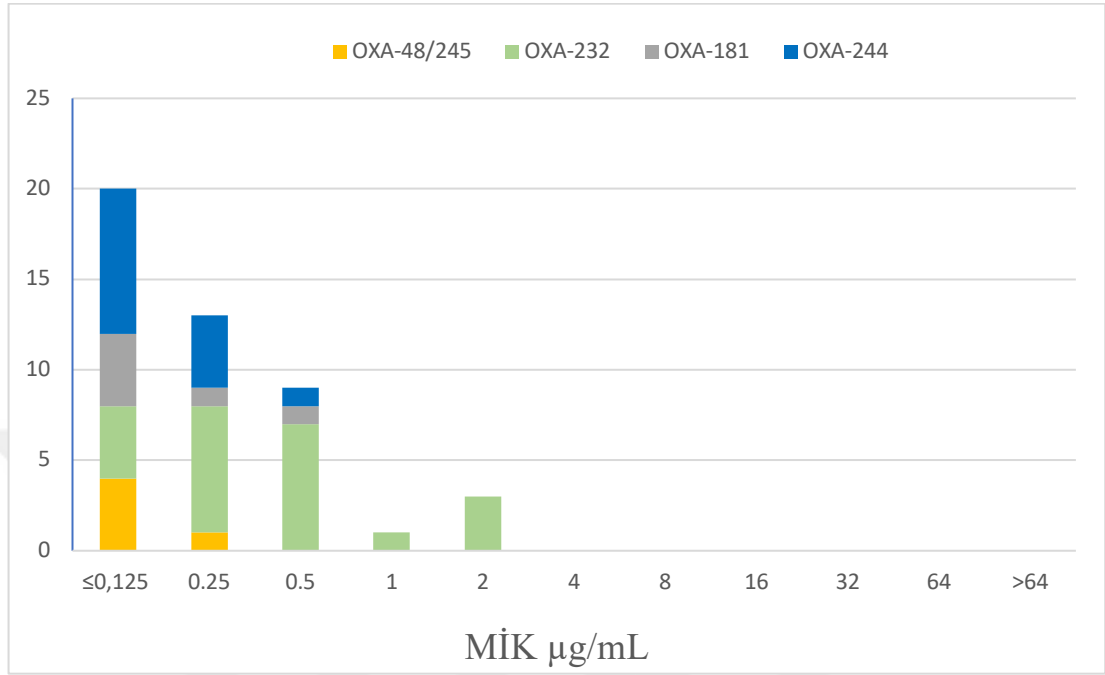
OXA-48 varyantlarının bakteri türüne göre meropenem ve imipenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri Tablo 14’de gösterilmiştir. OXA-48 varyantlarının bakteri türüne göre meropenem ve imipenem MİK₅₀ değerleri incelendiğinde, *E. coli* izolatlarında OXA-232 varyantında meropenem MİK₅₀ değeri, OXA-244 ve OXA-48/245’e göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur (p=0,003). *E. coli* izolatlarında meropenem MİK₅₀ değerleri OXA-232’de 0,25 µg/mLiken, OXA-48/245 ve OXA-181’de 0,125 µg/mLtespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarında varyantlara göre imipenem MİK düzeylerinde anlamlı fark saptanmamıştır.

Tablo 14. OXA-48 varyantlarının bakteri türüne göre meropenem ve imipenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

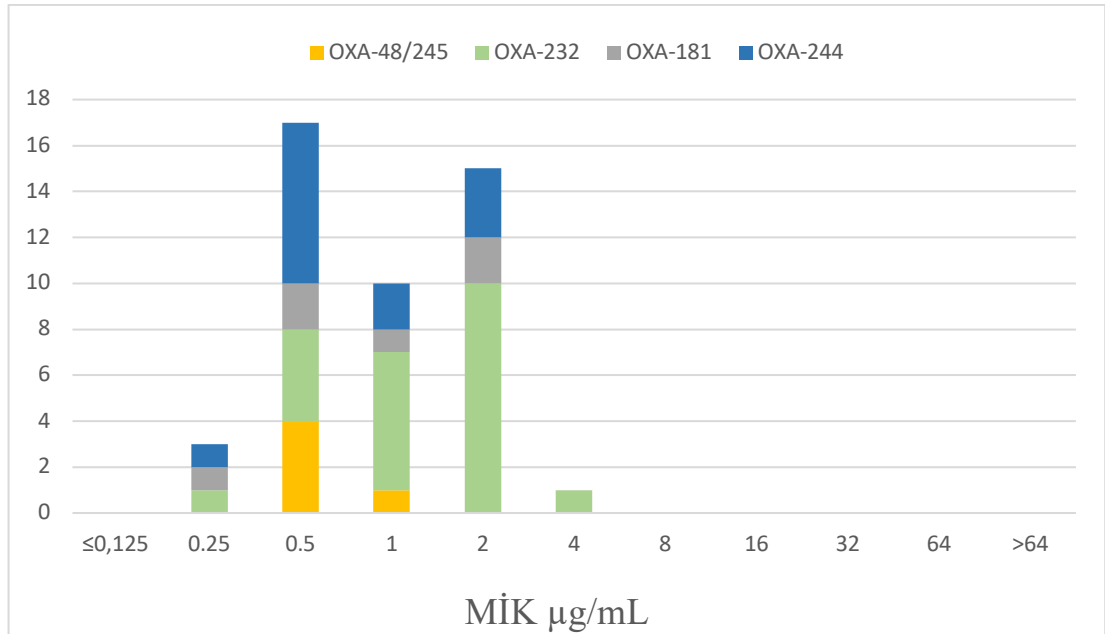
Organizma Grubu	Varyant	Meropenem			İmipenem		
		MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Dağılımı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Dağılımı
<i>K. pneumoniae</i>	OXA-1200	8	8	8-8	4	4	4-4
	OXA-181	16	32	<0,125->0,64	4	16	1-64
	OXA-232	16	32	<0,125->0,64	4	16	1->64
	OXA-244	0,25	0,25	0,25-0,25	1	1	1-1
	OXA-48/245	16	>64	<0,125->0,64	4	64	0,5->64
	p	0,485			0,367		
<i>E. coli</i>	OXA-181	0,125	0,5	<0,125-0,5	0,5	2	0,25-2
	OXA-232	0,25	2	<0,125-2	1	2	0,25-4
	OXA-244	0,125	0,25	<0,125-0,5	0,5	2	0,25-2
	OXA-48/245	0,125	0,25	<0,125-0,25	0,5	1	0,5-1
	p	0,003			0,059		
Diğer	OXA-162	2	8	0,5-8	16	32	1-32
	OXA-181	0,5	32	0,25-32	2	32	1-32
	OXA-232	0,5	32	<0,125-32	2	32	0,25-32
	OXA-244	8	>64	0,5->64	16	>64	1->64
	OXA-48/245	1	2	0,25-2	2	4	1-4
	p	0,681			0,479		

Diğer, *P. mirabilis*, *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *C. braakii*, *C. koseri*, *S. marcescens*.

E. coli izolatlarında varyantlara göre meropenem ve imipenem MİK dağılımları sırasıyla Şekil 17 ve Şekil 18’de gösterilmiştir.

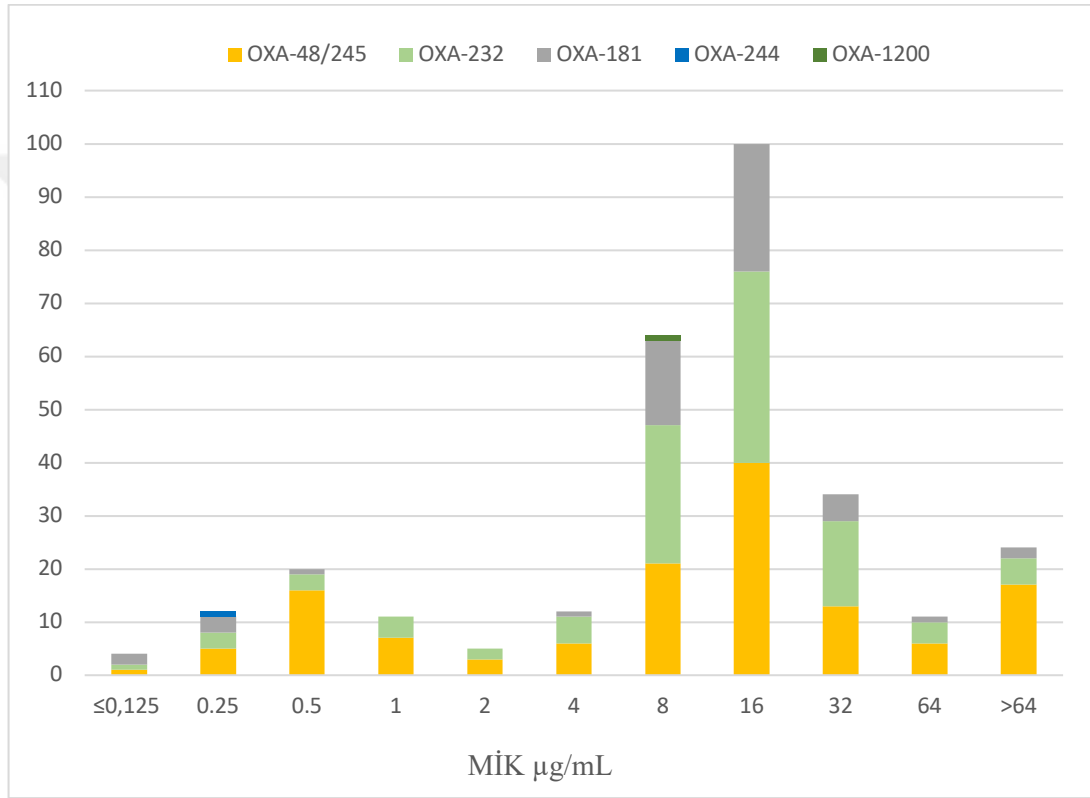


Şekil 17. *E. coli* izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı

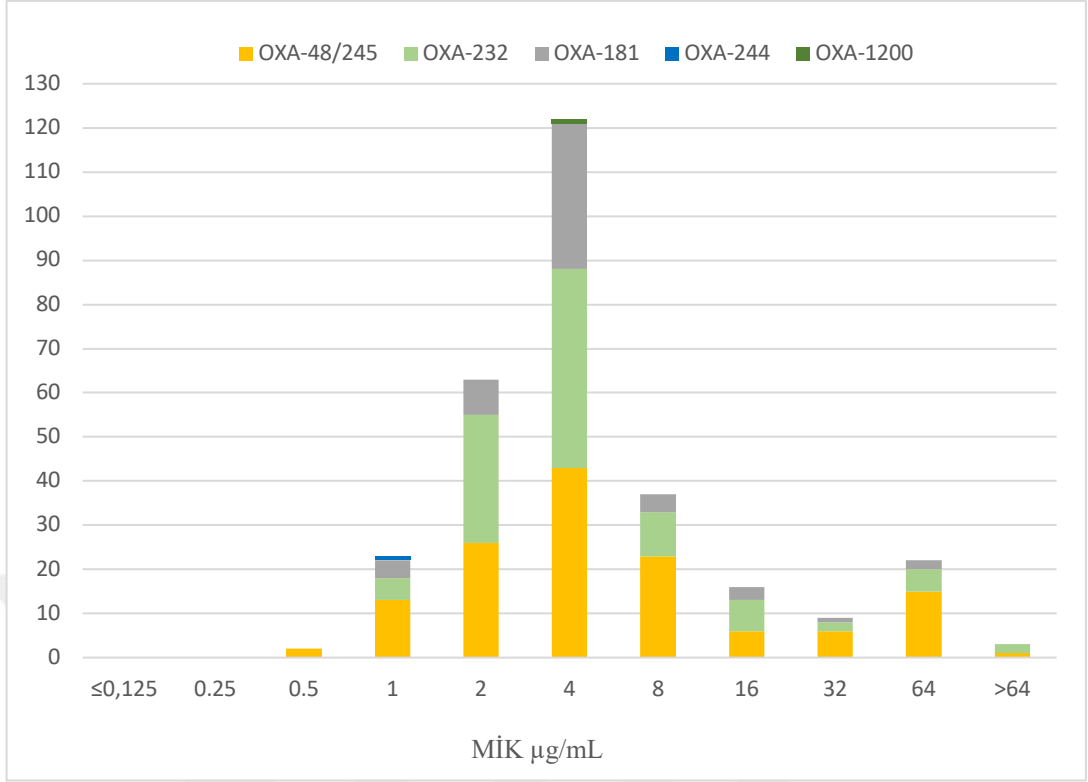


Şekil 18. *E. coli* izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı

K. pneumoniae izolatlarında varyantların meropenem ve imipenem MİK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 meropenem MİK₅₀ değerleri 16 µg/mL, imipenem MİK₅₀ değerleri 4 µg/mL olarak tespit edilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında varyantlara göre meropenem ve imipenem MİK dağılımları Şekil 19 ve Şekil 20’de gösterilmiştir.



Şekil 19. *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre meropenem MİK dağılımı



Şekil 20. *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 varyantlarına göre imipenem MİK dağılımı

Varyantların yıllara göre meropenem ve imipenem MİK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (Kruskal Wallis Testi, $p > 0,05$).

GSBL üreticisi olmayan izolatların (29/368) GSBL üreticilerine göre meropenem ($p < 0,001$) ve imipenem ($p < 0,021$) MİK değerleri anlamlı düşük saptanmıştır. GSBL üretimine göre meropenem ve imipenem MİK₅₀ değerleri Tablo 15’de gösterilmektedir.

Tablo 15. İzolatların GSBL üretimine göre meropenem ve imipenem MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerleri

GSBL	Meropenem			İmipenem		
	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Dağılımı	MİK ₅₀	MİK ₉₀	MİK Dağılımı
Pozitif	8	64	<0,125->64	4	32	0,25->64
Negatif	1	16	<0,125-16	2	4	0,5-8
p			<0,001			0,021

İkili karbapenemaz üreten izolatlarda hem meropenem hem imipenem MİK değerleri yüksek (MİK₅₀: 64 µg/mL) tespit edilmiştir. Tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinde ise meropenem için MİK₅₀ değeri 8 µg/mL iken, imipenem için 4 µg/mL olarak tespit edilmiştir. İkili karbapenemaz üreticilerinde imipenem ve meropenem MİK değerleri tekli karbapenemaz üreticilerine göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır (Mann Whitney U Testi, her ikisi için p<0,001).



5. TARTIŞMA

Çalışmamızda en sık tespit edilen varyant OXA-48/245 olmuştur. *K. pneumoniae* izolatlarında en sık OXA-48/245 ve OXA-232 varyantları tespit edilirken, *E. coli* izolatlarında en sık OXA-232 tespit edilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 varyantlarında meropenem direnci diğer varyantlara göre anlamlı yüksek saptanmıştır. OXA-181, OXA-232 ve OXA-48/245 varyantlarının meropenem MİK düzeyi OXA-244 varyantına göre yüksek bulunmuştur. OXA-48/245, OXA-232, OXA-181 ve OXA-162 varyantlarının imipenem MİK düzeyi OXA-244 varyantına göre yüksek bulunmuştur. Karba NP direkt testinin duyarlılığı OXA-48/245 ve OXA-232 varyantlarında diğer varyantlara göre yüksek, OXA-244 varyantında ise diğer varyantlara göre düşük tespit edilmiştir. İkili karbapenemaz üreticilerinde OXA-48/245 varyantı diğer varyantlara göre yüksek oranda saptanmıştır.

CRE türleri, küresel ölçekte halk sağlığı açısından ciddi bir tehdit oluşturan, tedavi seçenekleri kısıtlı ve mortalitesi yüksek kritik patojenlerdir. SMART kapsamında (2008-2014) 103.960 *Enterobacteriaceae* izolatı incelenmiş ve %1,4'ünde karbapenemaz geni tespit edilmiştir (41). Optimal Direnç İzleme için Uluslararası Ağ (INFORM) programı kapsamında 2012-2014 yılları arasında meropeneme duyarlı olmayan izolatların (n:961) %78,4'ünde en az bir karbapenemaz geni tespit edilmiştir (76). CRE insidansını araştırmak amacıyla beş coğrafi bölgeden ve 39 ülkeden 5 yıllık süre boyunca elde edilen 81,781 *Enterobacterales* izolatı incelenmiştir. İzolatların %3,3'ünün meropeneme duyarlı olmadığı tespit edilmiştir. 2012-2014 yılları arasında meropeneme duyarlı olmayan *Enterobacterales*'in oranı %2,7 iken, 2015-2017 yılları arasında bu oran %3,8'e yükselmiştir. Bu durumun, özellikle Latin Amerika'da KPC, Avrupa'da NDM, VIM ve OXA-48 benzeri karbapenemaz, Orta Doğu ve Asya-Pasifik'te ise OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif izolatların oranındaki artışa bağlı olabileceği vurgulanmıştır (30). ATLAS (2018-2022) sörveyans programı kapsamında 79,214 *Enterobacterales* izolatı incelenmiştir ve meropeneme duyarlı olmayan izolatların oranı Latin Amerika'da 2018'de %4,7 iken 2022'de %12,9'a ve Orta Doğu/Afrika'da 2018'de %5,7 iken 2022'de %10,4'e yükselmiştir. Avrupa'da 2018'de %3,9'dan 2021'de %6,5'e yükselen

bir eğilim göstermiş, ardından 2022'de %4,5'e düşmüştür. Asya-Pasifik bölgesinden izolatlar için CRE prevalansı 2020'de zirve yapmış (%11,3) ve daha sonra nispeten sabit kalmıştır. Kuzey Amerika'dan izolatlar ise 2018'de %2,6'dan 2022'ye kadar kademeli bir şekilde %1,1'e düşmüştür (77). Küresel sürveyans çalışmalarında, CRE izolatlarının büyük çoğunluğunu *K. pneumoniae*'nin oluşturduğu (%75,5-%76,7), *E. coli* ve *E. cloacae*'nin takip eden türler olduğu bildirilmiştir (30, 41). CPE türleri arasında da en sık tespit edilen türün *K. pneumoniae* olduğu bildirilmiştir (34).

Çalışmamız sırasında 2019-2023 yılları arasında hastane verilerimiz incelendiğinde, Enterobacterales izolatları arasında CRE oranı 2019 yılında %4,3 iken, 2023'de bu oranın %7,8'e yükseldiği görülmüştür. Bu bulgu, dünyada ve ülkemizde karbapenem direncinin zamanla artış eğiliminde olduğunu gösteren diğer çalışma verileriyle örtüşmektedir. Çalışmamızda, CRE izolatlarının tür dağılımı incelendiğinde, literatür verileriyle uyumlu olarak en sık tespit edilen tür %71,7 ile *K. pneumoniae* olmuştur. Bunu %10,1 ile *E. coli* ve %8,2 ile *Enterobacter spp.* takip etmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarının %17,5'i meropeneme, %29,6'sı imipeneme duyarlı tespit edilirken; *E. coli* izolatlarının %100'ü meropeneme, %97,8'i imipeneme duyarlı saptanmıştır.

Enterobacterales türlerinde yaygın olarak görülebilen karbapenemazlar karbapenem direncinde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biridir (18). Karbapenemaz enzimleri moleküler olarak üç beta-laktamaz sınıfında (Sınıf A, B ve D) yer alırlar. Karbapenemazların tespiti ve izlemi; kolay yayılan, tedavisi güç enfeksiyonlara sebep olması ve bölgesel farklılıklar göstermesi nedeniyle önem kazanmıştır. SMART (2008-2014) sürveyans programı verilerine göre CPE izolatlarının %53,2'si KPC, %20'si OXA-48 benzeri ve %19,4'ü NDM oluşturmuştur (41). 2008-2017 yılları arasında yayınlanan küresel sürveyans çalışmalarında, KPC %50 oranlarında seyrederek en yaygın karbapenemaz olarak raporlanırken, MBL ve OXA-48 benzeri karbapenemazlar %20 oranlarında bildirilmiştir (30, 41, 76). Ülkemizde yapılan sürveyans çalışmalarında 10 yıllık süreçte CPE izolatlarında OXA-48 benzeri karbapenemazlar en yaygın karbapenemaz olarak tespit edilirken; NDM, KPC ve OXA-48 benzeri+NDM birlikteliği artış eğilimi göstermiştir (42-44). İlk kez 2001 yılında Türkiye'de CR *K. pneumoniae* izolatında tanımlanan OXA-48, ülkemizde halen baskın karbapenemaz olarak varlığını sürdürmektedir (3).

Çalışmamızda CPE izolatlarının %68,6'sını (368/536) OXA-48 benzeri karbapenemazlar oluşturmaktadır. Bunu %22,6 (121/536) ile NDM, %15,8 (85/536) ile KPC takip etmiştir.

OXA-48 benzeri karbapenemazların diğer karbapenemazlar ile birlikte üretimi özellikle endemik bölgelerin kesişiminde bulunan ülkelerde önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır; örneğin, OXA-48+NDM-1 birlikte üretimi Orta Doğu ve Güney Asya kaynaklı *K. pneumoniae* suşlarında oldukça yaygınlaşmıştır (78). 2016-2018 yılları arasında 31 ülkede yapılan sürveyans çalışmasında, OXA-48 benzeri karbapenemazların %11,3'ünde (40/354) diğer karbapenemazlar ile birlikte üretimi tespit edilmiştir (79). Ülkemizde karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında OXA-48+NDM-1 birlikte üretimi 2013 yılında %2,1 oranında iken 2019 yılında bu oran %12,6'ya yükselmiştir (44). Nadiren VIM+OXA-48 ve KPC+OXA-48 birlikte üretimi raporlanmıştır (42, 44). Ülkemizde CR *Klebsiella spp.* izolatlarında yapılmış çok merkezli çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemazların %17'sinde (29/170) MBL ile birlikte üretim tespit edilmiştir (43). Çalışmamızda OXA-48 benzeri karbapenemazların %11,7'sinde (43/368) diğer karbapenemazlar ile birlikte üretim saptanmıştır. Bu oran, ülkemizde ikili karbapenemaz üreten izolatların artış eğilimi gösterdiğini raporlayan çalışmalar ile uyum göstermektedir (44).

OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantları arasında en yaygın olarak OXA-48, OXA-181, OXA-232 saptanırken, OXA-244, OXA-162, OXA-484 ve OXA-204 gibi varyantlar daha düşük sıklıkta rapor edilmiştir (38, 78). Varyantların bölgesel dağılımları da farklılık göstermektedir. OXA-48, *K. pneumoniae* izolatlarında sık görülmekte olup, Orta Doğu, Kuzey Afrika ve bazı Avrupa ülkelerinde endemiktir. OXA-181, *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında yaygın ve Sahra Altı Afrika ile Hint Yarımadası'nda endemiktir. OXA-232 ise 2019 yılından itibaren belirgin bir artış göstererek özellikle Hindistan, İngiltere ve Tayland'da endemik hale gelmiştir (27). 2018-2021 yılları arasında 42 ülkeyi içeren ATLAS sürveyans programı kapsamında 1.946 OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten Enterobacterales izolatı değerlendirilmiştir. *K. pneumoniae* %87'lik oranla en sık tespit edilen tür olurken, onu %6'lık oranla *E. coli* takip etmiştir. Bu çalışmada en yaygın varyant olarak OXA-232 (%40) saptanmış, bunu OXA-48 (%38) ve OXA-181 (%20) varyantları izlemiştir. *K. pneumoniae*'de en sık tespit edilen varyant OXA-48 olurken, *E. coli*'de en sık OXA-

181 varyantı tespit edilmiştir. Türkiye, bu çalışmada OXA-232 ve OXA-48'in baskın olduğu bölgeler arasında yer almıştır (6). Yapılan bir çalışmada, CR *K. pneumoniae* izolatlarının %45'inde (45/100) OXA-48 benzeri karbapenemaz geni saptanmıştır. OXA-48 varyantları incelediğinde ise, 41 izolatta OXA-48/245, iki izolatta OXA-181 ve iki izolatta OXA-244 tespit edilmiştir (51). Ülkemizde yapılmış çok merkezli bir çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten *Klebsiella spp.* izolatlarının %51'ini OXA-48 oluştururken, %31'ini OXA-232, %11'ini OXA-244 ve %3'ünü OXA-181 varyantının oluşturduğu tespit edilmiştir (43). Çalışmamızda, OXA-48 benzeri karbapenemaz genine sahip izolatlarda en yaygın varyantlar OXA-48/245 (%39,1), OXA-232 (%36,4) ve OXA-181 (%17,6) olmuştur. OXA-244 (%5,1), OXA-162 (%1,3) ve OXA-1200 (%0,2) tespit edilen diğer varyantlardır. Çalışmamızda baskın olarak tespit edilen varyantların Türkiye kaynaklı daha önce tanımlanmış varyantlara benzerliği, plazmid aracılı veya endemik klonal yayılım olasılığını düşündürmektedir. Mikroorganizma bazında değerlendirildiğinde en sık tespit edilen varyantlar *K. pneumoniae* izolatlarında %45,5 ile OXA-48/245, *E. coli* izolatlarında ise %47,8 ile OXA-232 olmuştur. Yıllara göre değerlendirildiğinde ise 2021-2022 yıllarında OXA-181 diğer yıllara göre daha yüksek oranda tespit edilirken, bu yıllarda OXA-48/245 daha düşük saptanmıştır. 2021-2022 yıllarında daha düşük oranda tespit edilen OXA-48 varyantı, tekrar artış eğilimi göstermiştir. OXA-48 varyantlarındaki bu değişimin belirtilen dönemde gerçekleşen fark edilmeyen salgınlar veya COVID-19 pandemisiyle olası ilişkisi için daha fazla veriye ihtiyaç vardır.

Global ölçekte bir çalışmada 2016-2018 yılları arasında, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların 40'ında (%11,3) diğer karbapenemazlar ile birliktelik saptanmıştır. Bu izolatların 20'sinde NDM-1+OXA-232 (Birleşik Krallık), 16'sında NDM-1+OXA-48 (Almanya, Belarus, Yunanistan, Türkiye), ikisinde NDM-5+OXA-232 (Birleşik Krallık), birinde NDM-1+OXA-181 (Türkiye) ve birinde KPC-2+OXA-232 (Tayland) tespit edilmiştir (79). Çalışmamızda, 24 izolatta OXA-48/245+NDM, dokuz izolatta OXA-232+NDM, dört izolatta OXA-48/245+KPC, üç izolatta OXA-181+NDM, iki izolatta OXA-244+NDM ve bir izolatta OXA-181+VIM tespit edilmiştir. Diğer karbapenemaz üreticileri ile en sık birliktelik gösteren varyant OXA-48/245 olmuştur. Bu durum, OXA-48/245 varyantının diğer karbapenemaz genleriyle

birlikte bulunma eğiliminin yüksek olabileceğini ve plazmidler aracılığıyla birlikte taşınma potansiyeline sahip olduğunu düşündürmektedir.

OXA-48 benzeri karbapenemazların tespiti, rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarları açısından önemli bir zorluk teşkil etmektedir. Bu durumun temel nedeni, bu enzimlerin fenotipik etkilerinin diğer karbapenemazlara kıyasla daha belirsiz bir şekilde ortaya çıkmasıdır. OXA-48 benzeri karbapenemazların zayıf hidrolitik aktiviteleri nedeniyle bu enzimlere sahip izolatlar karbapenemlere düşük-orta düzey direnç gösterebilir ve standart duyarlılık testlerinde karbapenemlere duyarlı görünebilirler. Spesifik bir fenotipik inhibitörü olmadığı için, rutin laboratuvarlarda OXA-48 benzeri karbapenemazların tespitinde Karba NP testi ve karbapenem inaktivasyon yöntemleri (CIM, mCIM) gibi genel karbapenemaz tarama testleri kullanılabilir (80). Nordmann ve Poirel'in geliştirdiği Karba NP testinin OXA-48 benzeri pozitif CPE dahil olmak üzere farklı karbapenemazları tanımlamak için yüksek duyarlılık ve özgüllük gösterdiği bildirilmiştir (59). Kanada'da yapılan bir çalışmada ise OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif CPE izolatlarında Karba NP testinin yanlış negatif sonuç verebildiği ve inokulum miktarının artırılmasıyla duyarlılığın %21'den %59'a çıktığı bildirilmiştir (81). Emeraud ve ark. tarafından yapılan çalışmada, Karba NP testi ile OXA-244 üreten *Enterobacterales* izolatlarının %47'sinde karbapenemaz üretimi tespit edilebilmiştir (82). Başka bir çalışmada Karba NP testinin duyarlılığı OXA-48 ve OXA-232 varyantlarında %100 bulunurken, OXA-181, OXA-162 ve OXA-244 varyantlarında sırasıyla %83,3, %80 ve %28,6 olarak saptanmıştır (83). Karba NP direkt test, doğrudan bakteri kolonileri ile uygulanabilen bir Karba NP modifikasyonu olup, bu testin, OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemazların tespitindeki duyarlılığı %83'ten %94'e yükselttiği gösterilmiştir (63). Bayraktar ve ark. tarafından laboratuvarımızda gerçekleştirilen, Karba NP direkt testinin performansının değerlendirildiği çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemaz izolatlarının %98,8'i (88/89) Karba NP direkt test ile karbapenemaz pozitif bulunmuştur (84). Bulgularımıza göre, tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların %70,5'i Karba NP direkt test ile pozitif olarak tespit edilmiştir. Karba NP direkt test sonuçları, OXA-48 varyantlarına göre değerlendirildiğinde; duyarlılığı OXA-48/245'de %75 ve OXA-232'de %72 bulunmuştur. Varyantların %5,1'ini (19/368)

oluşturan OXA-244 varyantında ise, karbapenemlere karşı zayıf hidrolitik aktivite göstermesi nedeniyle Karba NP direkt test oldukça düşük duyarlılık (%29,4) göstermiştir.

Zwaluw ve ark. tarafından geliştirilmiş, fenotipik karbapenemaz tespit yöntemi olan CIM, Karba NP ile uyumlu sonuç göstermiştir (55). CIM modifikasyonu olarak geliştirilmiş mCIM ise 2017'den beri CLSI tarafından önerilen fenotipik karbapenemaz tespit yöntemlerinden biridir (54). Tamma ve ark. yaptıkları çalışmada, mCIM testinin karbapenemaz tespitinde duyarlılığını %98 olarak bulmuşlar ve testin OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticilerinin tamamını tespit edebildiğini göstermişlerdir (61). OXA-48, OXA-232, OXA-181 ve OXA-162 varyantlarının da dahil olduğu bir çalışmada mCIM testinin OXA-48 benzeri izolatlarda karbapenemaz tespitinde %100 duyarlılığa sahip olduğu gösterilmiştir (83). CIM ve modifikasyonlarının performansının karşılaştırıldığı 20 OXA-48 benzeri (dokuz OXA-48, bir OXA-162, altı OXA-181 ve dört OXA-232) karbapenemaz pozitif izolatın dahil olduğu bir çalışmada iki OXA-232 pozitif izolat mCIM ile yanlış negatif olarak tespit edilmiştir (85). Çalışmamızda, tek başına OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların %72'si mCIM testi ile pozitif olarak tespit edilmiştir. OXA-244 üreten izolatların %64,7'sinde mCIM testinin pozitif sonuç vermesi, testin bu varyant için Karba NP direkt teste kıyasla daha yüksek bir duyarlılığa sahip olduğunu göstermektedir.

OXA-48 benzeri karbapenemazlar; penisilinleri yüksek düzeyde hidrolize ederken, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı zayıf hidrolitik aktivite gösteren, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmayan enzimlerdir. Bu nedenle, tespit edilen düşük MİK değerleri izolatların gözden kaçmasına ve direncin fark edilmeden yayılmasına neden olmaktadır (80). Özellikle karbapenemlere düşük hidrolitik aktivite gösteren karbapenemazların tespitini artırmak amacıyla, EUCAST tarafından önerilen tarama sınır değerleri, klinik duyarlılık sınır değerlerinden daha düşüktür. Karbapenemaz taraması için EUCAST tarafından önerilen, duyarlılık-özgüllük dengesi en iyi karbapenem meropenemdir (14). Ancak OXA-48 benzeri karbapenemaz pozitif izolatlarda meropenem ve imipenem duyarlılık görülebilmektedir. Bu nedenle OXA-48 benzeri karbapenemazların yaygın olduğu bölgelerde ertapenemin, düşük

özgüllüğe sahip olmasına rağmen taramada kullanılabilir en duyarlı karbapenem grubu antibiyotik olabileceği bildirilmiştir (42, 86). Çalışmamızda da OXA-48 benzeri karbapenemazların tamamı ertapeneme dirençli tespit edilmiştir.

OXA-48 varyantlarının hidrolitik aktivitelerindeki farklılıklar nedeniyle karbapenem duyarlılığı ve MİK değerlerinin değişkenlik gösterebildiği bildirilmiştir (6, 87). OXA-48 ve OXA-181'in imipenemi, meropeneme kıyasla daha güçlü hidrolize ettiği; OXA-232'nin ise OXA-48 ve OXA-181'e göre imipenemi daha zayıf hidrolize ettiği bildirilmiştir. (46). OXA-162, meropenem hariç karbapenemler için OXA-48 varyantına göre dört-sekiz kat daha yüksek MİK değerleri göstermiştir (26). Dimou ve ark. tarafından yapılan çalışmada, OXA-181 varyantında meropenem ve imipenem MİK değerlerinin OXA-48'e göre yüksek tespit edildiği bildirilmiştir (88). 2016-2020 yılları arasında küresel ölçekte yapılan bir çalışmada, OXA-48 varyantında meropenem ve imipeneme duyarlılık sırasıyla %20,7 ve %9,7 iken, bu oranlar OXA-181 varyantında %39,6 ve %26,1, OXA-232'de ise %8,4 ve %9,3 olarak tespit edilmiştir (87). ATLAS sürveyans çalışması kapsamında OXA-48 benzeri enzim saptanan izolatların karbapenem duyarlılıkları incelendiğinde, %12,5'i meropeneme, %6,9'u imipeneme duyarlı bulunmuştur. Bu oranlar OXA-232 üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarında sırasıyla %3,6 ve %5,5, OXA-232 üreticisi *E. coli* izolatlarında %57,9 ve %63,2 olarak tespit edilmiştir. OXA-244 üreticisi *E. coli* izolatlarında meropenem duyarlılığı %100, imipenem duyarlılığı %66,7 olarak bulunmuştur. OXA-181 üreticilerinde ise meropenem ve imipenem duyarlılık oranları sırasıyla *K. pneumoniae* izolatlarında %25,5 ve %15,4; *E. coli* izolatlarında ise %81 ve %50 olarak bulunmuştur. Genel olarak *K. pneumoniae* izolatlarında *E. coli* izolatlarına göre daha yüksek karbapenem MİK değerleri gözlenmiştir (6). Bulgularımıza göre, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreticisi izolatların %35'i meropeneme, %43,7'si imipeneme duyarlı saptanmıştır. OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarında meropenem ve imipenem duyarlılıkları sırasıyla OXA-48/245'de %35,3 ve %40,5, OXA-232'de %32 ve %47, OXA-181'de %22,9 ve %32,8, OXA-244'de %94,1 ve %94, OXA-162'de %60 ve %0 olarak tespit edilmiştir. OXA-232 üreticisi *K. pneumoniae* izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılığı sırasıyla %12,4 ve %32,4 iken, *E. coli* izolatlarında %100 ve %95,5 olarak saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 varyantlarında meropenem direnç oranı yüksek olarak

saptanmıştır. OXA-244 üreticisi *E. coli* izolatlarında meropenem ve imipenem duyarlılığı %100 bulunmuştur. Çalışmamızda literatür verileriyle uyumlu olarak MİK değerleri *K. pneumoniae* izolatlarında *E. coli* izolatlarına göre daha yüksek tespit edilmiştir.

Çalışmamızda OXA-48/245 ve OXA-181 varyantlarında meropenem MİK₅₀ değerleri 16 µg/mL bulunurken OXA-232'de 8 µg/mL, OXA-244'de ise 0,25 µg/mL bulunmuştur. İmipenem için MİK₅₀ değerleri OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181'de 4 µg/mL olurken, OXA-244'de 1 µg/mL, OXA-162'de ise 16 µg/mL tespit edilmiştir. Bulgularımıza göre, imipenemi meropenemden daha iyi hidrolize ettiği bilinen OXA-48/245 ve OXA-181 varyantlarında, meropenem MİK'lerinin imipenemden yüksek bulunduğu dikkat çekmektedir. OXA-244 varyantında diğer varyantlara kıyasla imipenem ve meropenem MİK değerleri daha düşük tespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarında OXA-232 varyantının meropenem MİK değerleri diğer varyantlara göre yüksek saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında ise varyantlara göre karbapenem MİK değerlerinde istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum yüksek MİK değerlerinin homojen dağılımı ile açıklanabilir. Duyarlılık kategorilerinin ve MİK değerlerinin bakteri türü ve OXA-48 varyantlarına göre farklılık göstermesi, varyant dağılımının enfeksiyon kontrolü ve tedavi stratejileri açısından taşıdığı büyük önemi açıkça ortaya koymaktadır.

OXA-48 benzeri karbapenemazlar çoğu zaman GSBL enzimleri ile birlikte üretilmektedir. Tek başına üretildiklerinde sefalosporinlere karşı düşük hidrolitik aktivite göstermeleri nedeniyle sefalosporinlere duyarlı tespit edilebilen OXA-48 benzeri karbapenemazlar, GSBL ile birlikte üretildiklerinde sefalosporinlere dirençli hale gelirler. Ayrıca, OXA-48 benzeri karbapenemazların GSBL ile birlikte üretilmesi, meropenem ve imipenem MİK değerlerinde artışa neden olmaktadır (87). Çalışmamızda da, GSBL üreticisi olmayan izolatların (29/368) GSBL üreticilerine göre meropenem ($p<0,001$) ve imipenem ($p<0,021$) MİK değerleri anlamlı düşük saptanmıştır.

İkili karbapenemaz üreticileri birden fazla direnç mekanizmasını bir arada yayabildikleri için enfeksiyon kontrolünde kritik önem taşımaktadırlar (47). OXA-48 benzeri karbapenemazların özellikle MBL gibi güçlü hidrolitik aktiviteye sahip karbapenemazlarla birlikteliği, meropenem ve imipenem MİK değerlerini artırmakta,

bu da tedavi yönetimini zorlaştırmaktadır (87). OXA-48 benzeri varyantlarının diğer karbapenemazlarla birlikte üretimi, özellikle OXA-48'in endemik olduğu bölgelerde MBL genlerinin de kazanılmasıyla giderek daha sık karşımıza çıkmaktadır. OXA-48 benzeri enzimlerin diğer karbapenemazlar ile birlikte bulunmasının yüksek düzeyde karbapenem direnci sağlayabileceği vurgulanmıştır (89). Bulgularımıza göre, ikili karbapenemaz üreticisi olarak tespit edilen 43 izolatın %65'ini (28/43) OXA-48/245 varyantı oluşturmaktadır. Literatür ile uyumlu olarak ikili karbapenemaz üreticilerinde meropenem ve imipenem MİK düzeyleri tekli karbapenemaz üreticilerine göre yüksek saptanmıştır ($p<0,001$). OXA-244 tespit ettiğimiz 19 izolatın 16'sının imipenem ve meropenem MİK değerleri $\leq 0,125-0,5$ $\mu\text{g/mL}$ arasındayken NDM ile birliktelik gösteren 2 izolatın meropenem MİK değerleri 32 $\mu\text{g/mL}$ ve >64 $\mu\text{g/mL}$, imipenem MİK değerleri ise 64 $\mu\text{g/mL}$ ve >64 $\mu\text{g/mL}$ tespit edilmiştir. Bu durum, tedavi başarısızlığı ve epidemiyolojik risk açısından önemli bir bulgudur. İkili karbapenemaz üreten izolatların doğru tanımlanması ve ilişkili varyantların yanı sıra direnç profillerinin titizlikle değerlendirilmesi, enfeksiyon kontrolü ve tedavi başarısı açısından kritik öneme sahiptir.

Çalışmamızın güçlü yanları; geniş bir zaman diliminde çok sayıda CPE izolatı değerlendirilmiş, OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının sıklık, fenotipik özellik, antimikrobiyal duyarlılık ve MİK düzeyleri gibi birçok özelliği irdelenmiştir. Çalışmamızın kısıtlılığı, OXA-48/245 varyantını tespit etmek için kullanılan primer bölgesindeki dizilimlerin aynı olması nedeniyle OXA-48 ve OXA-245 ayrımı yapılamamıştır.

6. SONUÇ

- Bu çalışmada, OXA-48 benzeri karbapenemazların yaygınlığının ve bunların karbapenem direnci üzerindeki etkilerinin varyantlar arasında belirgin farklılıklar gösterdiği ortaya koyulmuştur.

- En sık saptanan OXA-48 varyantları; OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 olmuştur. Bu varyantların dağılımı, bakteri türüne göre belirgin farklılık göstermiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında bu üç varyant daha yaygın bulunurken, *E. coli* izolatlarında özellikle OXA-232 varyantı öne çıkmıştır.

- OXA-48/245 varyantı diğer karbapenemaz genleri ile en sık birliktelik gösteren varyant olmuştur.

- OXA-244 varyantında Karba NP direkt test ve mCIM yalancı negatiflik oranı yüksek saptanmıştır. Bu bulgu, OXA-244 gibi karbapenemleri zayıf hidrolize eden varyantların rutin laboratuvar testleriyle tespitinin güç olabileceğini ve dolayısıyla bu dirençli suşların gizli yayılma potansiyeline sahip olduğunu ortaya koymaktadır.

- OXA-244 varyantında karbapenem MİK değerlerinin, diğer OXA-48 varyantlarına kıyasla daha düşük olduğu görülmüştür. Bu bulgu, OXA-48 varyantlarının karbapenemlere karşı oluşturduğu direnç düzeylerinin değişken olabileceğine işaret etmektedir.

- OXA-232 varyantı, özellikle *E. coli*'de yüksek meropenem MİK'leri ile dikkat çekmekte ve karbapenemaz tespitinde fenotipik test duyarlılığını azaltabilmektedir.

- İkili karbapenemaz üreten OXA-48 varyantlarında meropenem ve imipenem MİK değerlerinin belirgin yüksek olduğu görülmüştür. Birden fazla karbapenemaz genini birlikte taşıyan bu tür izolatların varlığı hem tanısal duyarlılığı azaltmakta hem de karbapenemlere karşı direnç düzeyini önemli ölçüde arttırarak tedavi seçeneklerini ciddi şekilde kısıtlamaktadır. Bu durumlarda moleküler doğrulama önem kazanmaktadır.

- *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48/245, OXA-232 ve OXA-181 varyantlarında meropeneme direnç oranı yüksek saptanmıştır.

- Elde edilen bulgular, OXA-48 benzeri karbapenemazların takibi ve varyant düzeyinde tanımlanmasının enfeksiyon kontrol stratejileri açısından kritik olduğunu

göstermektedir. Özellikle *K. pneumoniae* gibi hastane kaynaklı enfeksiyon etkenlerinde bu varyantların yaygınlığı, sağlık kurumlarında daha sıkı izolasyon önlemleri ve tarama programları uygulanmasını gerektirebilir.

- Çalışmamızda baskın olarak tespit edilen varyantların Türkiye kaynaklı daha önce tanımlanmış varyantlara benzerliği, endemik klonal yayılım olasılığını düşündürmektedir. Bu varyantların yayılım paterninin aydınlatılması için multilokus sekans tiplendirme ve tüm genom dizileme temelli moleküler epidemiyoloji çalışmaları faydalı olacaktır.

- Sonuç olarak, bu çalışma Türkiye'de OXA-48 benzeri karbapenemaz varyantlarının epidemiyolojisi üzerine kapsamlı veri sunan ilk çalışma olması nedeniyle özgün bir değer taşımaktadır. Çalışmamızın bulguları, ulusal düzeyde OXA-48 benzeri karbapenemazların izlenmesi ve bu konuda yapılacak ileri araştırmaların yönlendirilmesi açısından önemli bir temel teşkil etmektedir.

KAYNAKLAR

1. World Health Organization. (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance, to guide research, development, and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization.
2. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023-2021 data. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control and World Health Organization; 2023. <https://doi.org/10.2900/63495>.
3. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. 2004. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:15–22.
4. Brolund A, Lagerqvist N, Byfors S, Struelens MJ, Monnet DL, Albiger B, et al. 2019. Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance* 24.
5. Poirel L, Potron A, Nordmann P. 2012. OXA-48-like carbapenemases: The phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:1597–1606.
6. Lee YL, Wang WY, Ko WC, Hsueh PR. 2024. Global epidemiology and antimicrobial resistance of Enterobacterales harbouring genes encoding OXA-48-like carbapenemases: insights from the results of the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) programme 2018-2021. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 79:1581–1589.
7. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. 2016. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacterales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 66:5575–5599.
8. Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M. (2020). *Koneman’s color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Jones & Bartlett Learning.
9. Russo TA, Marr CM. 2019. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*.
10. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Marra M, Zummo S, Biondo C. 2023. Urinary Tract Infections: The Current Scenario and Future Prospects. *Pathogens*. MDPI <https://doi.org/10.3390/pathogens12040623>.
11. Weiner-Lastinger LM, Abner S, Edwards JR, Kallen AJ, Karlsson M, Magill SS, et al. 2020. Antimicrobial-resistant pathogens associated with adult healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network, 2015–2017. *Infect Control Hosp Epidemiol* 41:1–18.
12. Tamma PD, Heil EL, Justo JA, Mathers AJ, Satlin MJ, Bonomo RA. 2024. Infectious Diseases Society of America 2024 Guidance on the Treatment of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Infections. *Clinical Infectious Diseases* <https://doi.org/10.1093/cid/ciae403>.
13. Miller SI. 2016. Antibiotic resistance and regulation of the Gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *mBio* 7.
14. The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms v 2.0 (2017) https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf.

15. CDC. 2015. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) Update-CRE Toolkit.
16. Codjoe FS, Donkor ES. 2017. Carbapenem Resistance: A Review. *Med Sci (Basel)*. NLM (Medline) <https://doi.org/10.3390/medsci6010001>.
17. Potter RF, D'Souza AW, Dantas G. 2016. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Drug Resistance Updates*. Churchill Livingstone <https://doi.org/10.1016/j.drup.2016.09.002>.
18. Queenan AM, Bush K. 2007. Carbapenemases: The versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* <https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>.
19. Cerqueira GC, Earl AM, Ernst CM, Grad YH, Dekker JP, Feldgarden M, et al. 2017. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:1135–1140.
20. Bush K. 2018. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.
21. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. 2020. Metallo- β -lactamases: Structure, function, epidemiology, treatment options, and the development pipeline. *Antimicrob Agents Chemother* 64.
22. Poirel L, Naas T, Nordmann P. 2010. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* <https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>.
23. Bush K, Bradford PA. 2020. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology <https://doi.org/10.1128/CMR.00047-19>.
24. Evans BA, Amyes SGB. 2014. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 27:241–263.
25. Naas T, Oueslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. 2017. Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem* 32:917–919.
26. Kasap M, Torol S, Kolayli F, Dundar D, Vahaboglu H. 2013. OXA-162, a novel variant of OXA-48 displays extended hydrolytic activity towards imipenem, meropenem and doripenem. *J Enzyme Inhib Med Chem* 28:990–996.
27. Peirano G, Pitout JDD. 2025. Rapidly spreading Enterobacterales with OXA-48-like carbapenemases. *J Clin Microbiol* e0151524.
28. Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. 2011. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 55:2546–2551.
29. Potron A, Nordmann P, Poirel L. 2013. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:633–636.
30. Kazmierczak KM, Karlowsky JA, De Jonge BLM, Stone GG, Sahn DF. 2021. Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible Enterobacterales Collected as Part of a Global Surveillance Program, 2012 to 2017 <https://doi.org/10.1128/AAC>.
31. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1151–1161.

32. Van der Bij AK, Pitout JDD. 2012. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:2090–2100.
33. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA, Westblade LF. 2018. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>.
34. van Duin D, Doi Y. 2017. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>.
35. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. 2009. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 53:5046–5054.
36. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. 2019. NDM Metallo-Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings <https://doi.org/10.1128/CMR>.
37. Sabour S, Huang JY, Bhatnagar A, Gilbert SE, Karlsson M, Lonsway D, et al. 2021. Detection and characterization of targeted carbapenem-resistant health care-associated threats: Findings from the antibiotic resistance laboratory network, 2017 to 2019. *Antimicrob Agents Chemother* 65.
38. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. 2020. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. American Society for Microbiology <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>.
39. Peirano G, Matsumura Y, Adams MD, Bradford P, Motyl M, Chen L, et al. 2018. Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing enterobacter spp., 2008–2014. *Emerg Infect Dis* 24:1010–1019.
40. Nobrega D, Peirano G, Matsumura Y, Pitout JDD. 2023. Molecular Epidemiology of Global Carbapenemase-Producing *Citrobacter spp.* (2015–2017) . *Microbiol Spectr* 11.
41. Karlowski JA, Lob SH, Kazmierczak KM, Badal RE, Young K, Motyl MR, Sahm DF. 2017. In Vitro Activity of Imipenem against Carbapenemase-Positive *Enterobacteriaceae* Isolates Collected by the SMART Global Surveillance Program from 2008 to 2014. *J Clin Microbiol* 55:1638–1649.
42. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Özhak Baysan B. 2016. Türkiye’de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. *Mikrobiyol Bul* 50:21–33. *Mikrobiyol Bul* 50:21–33.
43. Isler B, Özer B, Çınar G, Aslan AT, Vatanserver C, Falconer C, et al. 2022. Characteristics and outcomes of carbapenemase harbouring carbapenem-resistant *Klebsiella spp.* bloodstream infections: a multicentre prospective cohort study in an OXA-48 endemic setting. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 41:841–847.
44. Süzük Yıldız S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, Numanoğlu Çevik Y, Hekimoğlu CH, Kiliç S, et al. 2021. The epidemiology of carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated in 2019 in Turkey. *Mikrobiyol Bul* 55:1–16.
45. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. 2011. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals:

- Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1274–1278.
46. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S et al. 2013. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem- hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* 41:325–329.
 47. Markovska R, Stankova P, Popivanov G, Gergova I, Mihova K, Mutafchiyski V, Boyanova L. 2024. Emergence of blaNDM-5 and blaOXA-232 Positive Colistin- and Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in a Bulgarian Hospital. *Antibiotics* 13.
 48. Aslan AT, Kırbaş E, Sancak B, Tanrıverdi ES, Otlu B, Gürsoy NC, et al. 2022. A retrospective observational cohort study of the clinical epidemiology of bloodstream infections due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an OXA-48 endemic setting. *Int J Antimicrob Agents* 59.
 49. Genç S, Kolaylı F, Özçelik EY. 2022. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first *K. pneumoniae* isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. *Journal of Infection and Chemotherapy* 28:192–198.
 50. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Gümrall R, Albay A. 2022. In Vitro Activity of Ceftazidime-avibactam and Colistin Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. *Mikrobiyol Bul* 56:218–229.
 51. Kahraman EP, Toptan H, Otlu B, Köroğlu M, Altindis M. 2019. Investigation of blaOXA-48-like genes in carbapenemase producing *Klebsiella spp.* Isolates. *Mikrobiyol Bul* 53:134–143.
 52. Simner PJ, Pitout JDD, Dingle TC. 2024. Laboratory detection of carbapenemases among Gram-negative organisms. *Clin Microbiol Rev* <https://doi.org/10.1128/cmr.00054-22>.
 53. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. (2017). Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 55(8), 2321-2333. *J Clin Microbiol* 55:2321–2333.
 54. 2023. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023. CLSI.
 55. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. 2015. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a simple and low-cost alternative for the carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in Gram-negative rods. *PLoS One* 10.
 56. Jing X, Min X, Zhang X, Gong L, Wu T, Sun R, et al. 2019. The Rapid Carbapenemase Detection Method (rCDM) for Rapid and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Cell Infect Microbiol* 9.
 57. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, et al. 2018. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Front Microbiol* 9.
 58. Sfeir MM, Hayden JA, Fauntleroy KA, Mazur C, Johnson JK, Simner PJ, et al. 2019. EDTA-Modified Carbapenem Inactivation Method: a Phenotypic Method for Detecting Metallo-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*.
 59. Normann P, Poirel L, Dortet L. 2012. Rapid Detection of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 18:1503–1507.

60. Cunningham SA, Limbago B, Traczewski M, Anderson K, Hackel M, Hindler J, et al. 2017. Multicenter performance assessment of Carba NP test. *J Clin Microbiol* 55:1954–1960.
61. Tamma PD, Opene BNA, Gluck A, Chambers KK, Carroll KC, Simner PJ. 2017. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 55:1046–1055.
62. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2012. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas spp.* by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother* 56:6437–6440.
63. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. 2015. Simplified protocol for Carba NP test for enhanced detection of carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 53:3908–3911.
64. Richter SS, Marchaim D. 2017. Screening for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Who, When, and How? Virulence. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1255381>.
65. Hrabák J, Walková R, Študentová V, Chudáčková E, Bergerová T. 2011. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 49:3222–3227.
66. Boutal H, Naas T, Devilliers K, Oueslati S, Dortet L, Bernabeu S, et al. 2017 Development and Validation of a Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of NDM-Producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 55:2018–2029.
67. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G, et al. 2018. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73:909–915.
68. Ellington MJ, Ekelund O, Aarestrup FM, Canton R, Doumith M, Giske C, et al. 2017. The role of whole genome sequencing in antimicrobial susceptibility testing of bacteria: report from the EUCAST Subcommittee. *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.012>.
69. Turner P, Fox-Lewis A, Shrestha P, Dance DAB, Wangrangsimakul T, Cusack TP, et al. 2019. Microbiology Investigation Criteria for Reporting Objectively (MICRO): A framework for the reporting and interpretation of clinical microbiology data. *BMC Med* 17.
70. von Elm E, Altman DG, Egger M, Pocock SJ, Gøtzsche PC, Vandenbroucke JP. 2008. The Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology (STROBE) statement: guidelines for reporting observational studies. *J Clin Epidemiol* 61:344–349.
71. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 15.0, 2025. <https://www.eucast.org>.
72. Dashti AA, Dashti H. 2009. Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques Article in The Journal of the Kuwait Medical Association.
73. CLSI. M07-A9: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition.

74. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 15.0, 2025. <http://www.eucast.org>. EUCAST.
75. 2024. Broth microdilution-EUCAST reading guide v 5.0 (2024) <http://www.eucast.org>.
76. De Jonge BLM, Karlowsky JA, Kazmierczak KM, Biedenbach DJ, Sahm DF, Nichols WW. 2016. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible *Enterobacteriaceae* isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). *Antimicrob Agents Chemother* 60:3163–3169.
77. Wise MG, Karlowsky JA, Mohamed N, Hermsen ED, Kamat S, Townsend A, et al. 2024. Global trends in carbapenem- and difficult-to-treat-resistance among World Health Organization priority bacterial pathogens: ATLAS surveillance program 2018–2022. *J Glob Antimicrob Resist* 37:168–175.
78. Boyd SE, Holmes A, Peck R, Livermore DM, Hope W. 2022. OXA-48-Like β -Lactamases: Global Epidemiology, Treatment Options, and Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother*. American Society for Microbiology <https://doi.org/10.1128/aac.00216-22>.
79. Castanheira M, Doyle TB, Collingsworth TD, Sader HS, Mendes RE. 2021. Increasing frequency of OXA-48-producing Enterobacterales worldwide and activity of ceftazidime/avibactam, meropenem/vaborbactam and comparators against these isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76:3125–3134.
80. Koroska F, Göttig S, Kaase M, Steinmann J, Gatermann S, Sommer J, et al. 2017. Comparison of phenotypic tests and an immunochromatographic assay and development of a new algorithm for detection of OXA-48-like carbapenemases. *J Clin Microbiol* 55:877–883.
81. Tijet N, Boyd D, Patel SN, Mulvey MR, Melano RG. 2013. Evaluation of the carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 57:4578–4580.
82. Emeraud C, Biez L, Girlich D, Jousset AB, Naas T, Bonnin RA, et al. 2020. Screening of OXA-244 producers, a difficult-to-detect and emerging OXA-48 variant? *J Antimicrob Chemother* 75:2120–2123.
83. Schaffarczyk L, Noster J, Stelzer Y, Sattler J, Gatermann S, Hamprecht A. 2024. Detection of rare carbapenemases in Enterobacterales—comparison of two colorimetric and three CIM-based carbapenemase assays. *Microbiol Spectr* 12.
84. Bayraktar B, Barış A, Malkoçoğlu G, Erdemir D, Kına N. 2019. Comparison of Carba NP-Direct, Carbapenem Inactivation Method, and β -CARBA Tests for Detection of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*. *Microbial Drug Resistance* 25:97–102.
85. Howard JC, Creighton J, Ikram R, Werno AM. 2020. Comparison of the performance of three variations of the Carbapenem Inactivation Method (CIM, modified CIM [mCIM] and in-house method (iCIM)) for the detection of carbapenemase-producing Enterobacterales and non-fermenters. *J Glob Antimicrob Resist* 21:78–82.
86. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013;18(31):pii=20549. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20549>.
87. Stone G, Wise M, Utt E. 2024. In vitro activity of ceftazidime–avibactam and comparators against OXA-48-like Enterobacterales collected between 2016 and 2020. *Microbiol Spectr* 12.

88. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. 2012. Characterization of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67:1660–1665.
89. Kazi MSARC. 2015. The carbapenemase menace: do dual mechanisms code for more resistance? *Infect Control Hosp Epidemiol* 36:116–117.

