



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA  
KARBAPENEM DİRENCİNİ SAPTAMAKTA  
KULLANILAN FENOTİPİK YÖNTEMLERİN  
PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**2024  
YÜKSEK LİSANS TEZİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ**

**Muharrem NASLI**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr.Üyesi Şerife YILMAZ**

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KLEBSIELLA  
PNEUMONIAE İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİ  
SAPTAMAKTA KULLANILAN FENOTİPİK YÖNTEMLERİN  
PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI**

**Muharrem NASLI**

**Tez Danışmanı  
Dr. Öğr. Üyesi Şerife YILMAZ**

**T.C.  
Karabük Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında  
Yüksek Lisans Tezi  
Olarak Hazırlanmıştır**

**KARABÜK  
Ocak 2024**

Muharrem NASLI tarafından hazırlanan “KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİ SAPTAMAKTA KULLANILAN FENOTİPİK YÖNTEMLERİN PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI” başlıklı bu tezin Yüksek Lisans Tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Şerife YILMAZ

Tez Danışmanı, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından Oy Birliği ile Anabilim Dalınız Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 16/01/2024

Ünvanı, Adı SOYADI (Kurumu)

İmzası

Başkan : Prof. Dr. Hasan SOLMAZ (KBÜ)

.....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Şerife YILMAZ (KBÜ)

.....

Üye : Doç. Dr. Elçin KAL ÇAKMAKLIOĞULLARI (ALKÜ)

ONLİNE

KBÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulu, bu tez ile, Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Zeynep ÖZCAN

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü



*“Bu tezdeki tüm bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak elde edildiğini ve sunulduğunu; ayrıca bu kuralların ve ilkelerin gerektirdiği şekilde, bu çalışmadan kaynaklanmayan bütün atıfları yaptığımı beyan ederim.”*

Muharrem NASLI

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

# KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN KLEBSİELLA PNEUMONİAE İZOLATLARINDA KARBAPENEM DİRENCİNİ SAPTAMAKTA KULLANILAN FENOTİPİK YÖNTEMLERİN PERFORMANSLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

**Muharrem NASLI**

**Karabük Üniversitesi**

**Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı:**

**Dr. Öğr. Üyesi Şerife YILMAZ**

**Ocak 2024, 66 sayfa**

Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae'nın neden olduğu enfeksiyonlar küresel bir tehdit haline gelmiştir. Özellikle çoklu ilaca direnç, çeşitli bakteri türleri arasında endişe verici bir oranda artmakta ve hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü "Bakteriyel antimikrobiyal direncin 2019 yılında küresel 1,27 milyon ölümden doğrudan sorumlu olduğu ve 4,95 milyon ölüme katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir" şeklinde açıklaması bulunmaktadır. Çoğu zaman tedavinin son seçeneği olan karbapenemlere karşı artan direnç yaygınlaşmaktadır. Karbapenemaz üreten kökenlerin ve aynı zamanda taşıyıcıların da erken ve hızlı tanımlanması, bu yüksek dirençli patojenlerin yayılmasını önlemek için zorunludur. Taşıyıcıların erken tanımlanması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanması, karbapenemazın neden olduğu hastane kaynaklı salgınları önlemenin tek yoludur ve sınırlı tedavi seçeneği vardır. Bu sebeple karbapenemazların hızlı ve doğru tespiti için moleküler yöntemler ve fenotipik

yöntemler kullanılmaktadır. Moleküler yöntemler zahmetli olup, deneyimli personel, ekipman gereksinimi ve maliyet gibi kısıtlamalar söz konusudur. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) karbapenem duyarlılığı azaldığında karbapenemaz tespiti için fenotipik testleri önerdiği için biz de iki merkezli çalışmamızda fenotipik yöntemlerin performanslarını karşılaştırıp değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmaya Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi ile Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarlarına çeşitli kliniklerden gönderilen ve izole edilen 100 *K.pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Suşların tanımlamaları ve karbapenem duyarlılıkları BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA) ile yapılmıştır. Çalışmaya dahil edilen suşlarda karbapenemaz varlığını tespit etmek için CIM, sCIM, mCIM ve mCIM-A testleri çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen kökenlerde karbapenemaz direnç genini tespit etmek için altın standart olarak kabul edilen PCR yöntemi kullanılmıştır. Real time PCR yöntemi ile KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-51, OXA-23-58 ve OXA-48 direnç genleri araştırılmıştır. Çalışılan fenotipik testler altın standart yöntem olan PCR ile karşılaştırılarak performansları değerlendirilmiştir.

Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve izole edilen 50 *K. pneumoniae* suşunda CIM, sCIM, mCIM ve mCIM-A testlerinin özgüllüğü %100; duyarlılıkları ise sırasıyla %90, %94, %92 ve %98 olarak tespit edilmiştir. Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen ve izole edilen 50 *K. pneumoniae* suşunda ise CIM, sCIM, mCIM ve mCIM-A testlerinin özgüllüğü %100; duyarlılıkları ise sırasıyla %82, %88, %90 ve %90 olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllükleri yüksek oranda saptanmış olup mCIM-A yöntemi karbapenem direncini saptamada en etkin yöntem olarak bulunmuştur

**Anahtar Sözcükler** : Karbapenem direnci, CIM (Karbapenem İnaktivasyon Metodu), mCIM (Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu), sCIM (Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu), mCIM-A (Amonyum bikarbonat ilaveli Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu)

**Bilim Kodu** : 1039.09

## **ABSTRACT**

**Master Thesis**

### **COMPARISON OF THE PERFORMANCE OF PHENOTYPIC METHODS USED TO DETECT CARBAPENEM RESISTANCE IN KLEBSIELLA PNEUMONIAE ISOLATES FROM CLINICAL SAMPLES**

**Muharrem NASLI**

**Karabük University**

**Institute of Graduate Programs**

**Department of Medical Microbiology**

**Thesis Advisor:**

**Assist. Prof. Dr. Şerife YILMAZ**

**January 2024, 66 pages**

Infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae have become a global threat. Especially multidrug resistance is increasing at a concerning rate among various bacterial species, causing both hospital-acquired and community-acquired infections. The World Health Organization has stated that bacterial antimicrobial resistance was directly responsible for an estimated 1.27 million deaths globally in 2019 and contributed to 4.95 million deaths." Increasing resistance to carbapenems, often the last treatment resort, is becoming widespread. Early and rapid identification of infected patients and carriers producing carbapenemases is essential to prevent the spread of these highly resistant pathogens. Early identification of carriers and implementation of infection control measures is the only way to prevent hospital-acquired outbreaks caused by carbapenemases, and there are limited treatment options. Therefore, molecular and phenotypic methods are used for the rapid and accurate detection of carbapenemases. "Molecular methods are subject to limitations such as labor

intensiveness, requirement for experienced personnel, equipment, and cost." Since European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) recommends phenotypic tests for the detection of carbapenemases, if sensitivity of carbapenem susceptibility tests decreases. Therefore we aimed to compare and evaluate the performance of phenotypic methods in our two-center study.

The study included 100 *K. pneumoniae* strains isolated from various clinics and sent to the Microbiology laboratories of Karabük Training and Research Hospital and Balıkesir Atatürk City Hospital. The strains were identified and their carbapenem susceptibilities were determined using the BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, USA)." CIM, sCIM, mCIM, and mCIM-A tests were performed to detect the presence of carbapenemases in the included strains." The gold standard test, PCR, considered the gold standard for detecting the resistance gene of each included strain, was performed. The resistance genes KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-51, OXA-23, OXA-58, and OXA-48 were investigated using the real-time PCR method. The performance of the studied phenotypic methods was evaluated by comparing them with the gold standard method, PCR.

The specificity and sensitivity of CIM, sCIM, mCIM, and mCIM-A tests were 100%, 90%, 94%, 92%, and 98%, respectively, for 50 *K.pneumoniae* strains isolated from the microbiology laboratory of Karabük Training and Research Hospital. We determined the specificity of CIM, sCIM, mCIM, and mCIM-A tests for the 50 *K.pneumoniae* strains sent to the Microbiology laboratory of Balıkesir Atatürk City Hospital as 100%, and their sensitivities as 82%, 88%, 90%, and 90% respectively.

In our study, the sensitivity and specificity of phenotypic tests were found to be high, and the mCIM-A method was found to be the most effective method in detecting carbapenem resistance.

**Key Word** : Carbapenem Resistance, CIM (Carbapenem Inactivation Method), mCIM (Modified Carbapenem Inactivation Method), sCIM (Simplified Carbapenem Inactivation Method), mCIM-A (Modified Carbapenem Inactivation method with ammonium bicarbonate)

**Science Code** : 1039.09

## TEŞEKKÜR

İlk olarak, danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Şerife YILMAZ'a en içten şükranlarımı sunarım. Bu tez çalışmasının planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, bilgeliği, sabrı ve rehberliği olmadan bu çalışmayı tamamlamam mümkün olamazdı. Her zaman yol gösterici ve destekleyici oldu, kendisine minnettarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgisini cömertçe sunan değerli hocalarım Doç. Dr. Nergiz AŞGIN ve Prof. Dr. Hasan SOLMAZ'a, 6 Şubat depremlerinde Hatay'da gönüllü olarak birlikte çalışma fırsatı bulduğum ve bilgisinden çokça yararlandığım Uzm. Dr. Betül GÜNAYDIN'a,

Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışan ve her durumda desteğini esirgemeyen arkadaşım Necmettin ÖZSOY'a

Hayatım boyunca desteklerini hep yanımda hissettiğim annem, babam ve kardeşlerime, desteği ve sevgisiyle her an yanımda olan eşime,

“Hayatta en hakiki mürşid ilimdir, fendir” diyerek yolumuzu aydınlatan, ülkemizin kurucu lideri Ulu önderimiz Mustafa Kemal Atatürk'e

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Bu tez çalışması Karabük Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü(BAP) tarafından desteklenmiştir. (KBÜBAP-22-YL-161).

## İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
KABUL.....	ii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER .....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
BÖLÜM 1 .....	1
GİRİŞ .....	1
BÖLÜM 2 .....	3
GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. KLEBSİELLA PNEUMONİAE TARİHÇESİ VE TAKSONOMİSİ.....	3
2.2. KLEBSİELLA PNEUMONİAE’NİN MORFOLOJİSİ.....	3
2.3. VİRÜLANS FAKTÖRLERİ.....	4
2.3.1. Kapsül.....	4
2.3.2. Lipopolisakkaritler.....	4
2.3.2. Fimbria.....	4
2.3.2. Siderefor .....	5
2.4. KLİNİK ÖNEMİ VE EPİDEMİYOLOJİSİ .....	5
2.5. ANTİBAKTERİYEL İLAÇLAR.....	6
2.5.1. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler.....	10
2.6. ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI.....	11
2.6.1. Beta Laktam Grubu Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları.....	12
2.6.2. Karbapenem Direnci.....	13

	<b><u>Sayfa</u></b>
2.6.2.1. Sınıf A Karbapenemaz .....	15
2.6.2.2. Sınıf B Karbapenemaz .....	15
2.6.2.3. Sınıf D Karbapenemaz .....	17
2.7. TÜRKİYE'DEKİ KARBAPENEMAZ EPİDEMİYOLOJİSİ .....	17
2.8. KARBAPENEMAZLARIN FENOTİPİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ .....	19
2.8.1. Modifiye Hodge Testi .....	19
2.8.2. Kombine Disk Yöntemi .....	19
2.8.3. Karbapenem İnaktivasyon Yöntemi .....	19
2.8.4. Biyokimyasal Yöntemler .....	20
2.8.5. İmmunokromatografik Yöntemler .....	20
2.8.6. Kültür Bazlı Yöntemler .....	20
2.8.7. MALDI TOF MS .....	21
2.9. KARBAPENEMAZLARIN GENOTİPİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ .....	21
2.9.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	21
2.9.2. Oligonükleotid Hibridizasyon Yöntemi .....	22
2.9.3. Klonal İlişkinin Moleküler Analizi .....	22
<b>BÖLÜM 3 .....</b>	<b>23</b>
<b>MATERYAL VE METOD .....</b>	<b>23</b>
3.1. ÇALIŞMANIN ÖRNEKLEMİ .....	23
3.2. ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN GÖNDERİLEN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, İZOLASYONU .....	23
3.3. ÇEŞİTLİ KLİNİK ÖRNEKLERDEN GÖNDERİLEN ÖRNEKLERİN TANIMLANMASI VE KARBAPENEM DİRENCİNİN TANIMLANMASI .....	24
3.3.1. BD Phoenix™ 100 .....	24
3.3.2. Gradyent Test .....	24
3.4. FENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ TESPİTİNİN YAPILMASI .....	25
3.4.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu .....	25
3.4.2. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu .....	26
3.4.3. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu .....	27

	<b><u>Sayfa</u></b>
3.4.4. Amonyum bikarbonat İlaveli Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu .....	27
3.5. GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI .....	29
2.5.1. DNA İzolasyonu .....	29
2.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu .....	30
2.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi .....	31
3.6. İSTATİKSEL ANALİZ .....	31
BÖLÜM 4 .....	32
BULGULAR.....	32
BÖLÜM 5 .....	46
TARTIŞMA .....	46
BÖLÜM 6 .....	55
SONUÇLAR .....	55
KAYNAKLAR .....	56
ÖZGEÇMİŞ .....	66

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
Şekil 3.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu .....	26
Şekil 3.2. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu.....	27
Şekil 3.3. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Modifikasyonlarının Karbapenemaz Negatifliği .....	28
Şekil 3.4. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Modifikasyonlarının Karbapenemaz Pozitifliği. ....	29



## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Klebsiella Pneumoniae'nin taksonomisi.....	3
Çizelge 2.2. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları ve etki spektrumları.....	7
Çizelge 2.3. Beta laktam grubu antibiyotikler .....	11
Çizelge 2.4. Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları..	13
Çizelge 2.5. Karbapenemazların sınıflandırılması. ....	14
Çizelge 3.1. qPCR programı .....	30
Çizelge 4.1. KEAH izolatların geldiği servisler. ....	32
Çizelge 4.2. BAŞH izolatların geldiği servisler .....	32
Çizelge 4.3. KEAH mikrobiyoloji laboratuvarına gelen izolatların numune türüne göre dağılımı.....	33
Çizelge 4.4. BAŞH mikrobiyoloji laboratuvarına gelen izolatların numune türüne göre dağılımı.....	33
Çizelge 4.5. KEAH mikrobiyoloji laboratuvarına gelen izolatların fenotipik yöntemler ile saptanan inhibisyon zon çapı ve PCR direnç genleri .....	34
Çizelge 4.6. BAŞH mikrobiyoloji laboratuvarına gelen izolatların fenotipik yöntemler ile saptanan inhibisyon zon çapı ve PCR direnç genleri. ....	36
Çizelge 4.7. KEAH mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen numunlerin karbapenemaz direnç profillerinin sınıflandırılması .....	38
Çizelge 4.8. BAŞH mikrobiyoloji laboratuvarında izole edilen numunlerin karbapenemaz direnç profillerinin sınıflandırılması. ....	38
Çizelge 4.9. KEAH CIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi. ....	39
Çizelge 4.10. BAŞH CIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi.....	40
Çizelge 4.11. CIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları.....	40
Çizelge 4.12. KEAH mCIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi.....	41
Çizelge 4.13. BAŞH mCIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi. ....	41
Çizelge 4.14. mCIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları.....	42
Çizelge 4.15. KEAH sCIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi.....	42
Çizelge 4.16. BAŞH sCIM ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi. ....	43
Çizelge 4.17. sCIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları .....	43
Çizelge 4.18. KEAH mCIM-A ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi.....	44
Çizelge 4.19. BAŞH mCIM-A ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi. ....	44

Çizelge 4.20. mCIM-A yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları ..... 45



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### SİMGELER

$\mu\text{m}$	: Mikrometre
NaCl	: Sodyum Klorür
Zn <sup>2+</sup>	: Çinko
$\mu\text{g}$	: Mikrogram
$\mu\text{L}$	: Mikrolitre
mL	: Mililitre
mM	: Milimolar
mm	: Milimetre
rpm	: Revolutions Per Minute(Dakikadaki devir sayısı)

## KISALTMALAR

- EUCAST : European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi)
- CAESAR : Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance (Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans)
- ECDC : European Centre for Disease Prevention and Control (Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi)
- ICARE : Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology (Yoğun Bakım Antimikrobiyal Direnç Epidemiyolojisi)
- MİK : Minimal İnhibitör Konsantrasyon
- MBL : Metallobetalaktamaz
- SME : Serratia Marcescens Enzyme
- GES : Guiana Extended Spectrum
- NmcA : Non-metallo carbapenemase-A
- GSBL : Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
- GNB : Gram Negatif Bakteri
- EDTA : Etilendiamintetraasetik Asit
- PBP : Penisilin Bağlayıcı Protein
- K.P. : Klebsiella Pneumoniae
- LPS : Lipopolisakkarit
- DNA : Deoksiribonükleik Asit
- CLSI : Clinical Laboratory Standards Institute (Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü)
- KDE : Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae
- OXA : Oksasilinaz
- VIM : Verona Integron Encoded Metallo beta lactamase
- IMP : Imipenemase Metallo beta lactamase
- NDM : New Delhi Metallo beta lactamase
- KPC : Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase
- PCR : Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
- DSÖ : Dünya Sağlık Örgütü
- CIM : Carbapenem Inactivation Method (Karbapenem İnaktivasyon Metodu)

- MCIM : Modified Carbapenem Inactivation Method (Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu)
- sCIM : Simplified Carbapenem İnactivation Method (Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu)
- mCIM-A : Modified Carbapenem İnactivation Method with ammonium bicarbonate (Amonyum bikarbonat ilaveli Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu)
- KEAH : Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi
- BAŞH : Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi



## BÖLÜM 1

### GİRİŞ

Karbapenem dirençli Enterobacteriaceae (KDE)'nin hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesi, uygun antimikrobiyal tedavinin başlatılması ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması için esastır [1]. Çoklu ilaca dirençli patojenlerin oranı gittikçe artmaktadır. Bu epidemiyolojik ve mikrobiyolojik sorun, enfeksiyon kontrolü açısından bir zorluk oluşturmakta olup hasta güvenliği için ciddi bir tehdit haline gelmiştir. Aynı organizmanın duyarlı suşları tarafından oluşturulan enfeksiyonlara kıyasla, birçok antibiyotiğe dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar, daha uzun hastanede kalma süreleri, yüksek mortalite oranları ve daha yüksek sağlık harcamaları gibi sonuçlarla ilişkilendirilmiştir. Bu kötü sonuçlar muhtemelen altta yatan hastalığın daha ciddi olması, etkili tedavinin başlatılmasında gecikmeler ve bazı durumlarda etkili antimikrobiyal tedavinin eksikliği gibi çoklu etiyolojik faktörlerden kaynaklanmaktadır [2]. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin 2022 yılında yayınladığı rapor incelendiğinde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* oranında ciddi bir artış olduğu görülmektedir[3].

*K. pneumoniae*'de karbapenemlere direnç, farklı mekanizmalarla ilişkilendirilmiştir. Permeabilite bozukluklarının bir araya gelmesi, çok zayıf karbapenemaz aktivitesine sahip  $\beta$ -laktamazların üretimiyle birlikte, karbapenemlere direnç gelişimine neden olabilir. Bu enzimler ya Ambler sınıfı A geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar ya da Ambler sınıfı C AmpC sefalosporinazları olabilir ve bazı durumlarda, permeabilite bozuklukları ile birleştiğinde azalmış karbapenem duyarlılığına daha fazla katkıda bulunabilirler.  $\beta$ -laktamazları içeren bu mekanizmaların dışında, karbapenem-hidroliz etkinliği önemli olmayan, gerçek karbapenemazlar *K. pneumoniae*'de ek permeabilite bozuklukları olmaksızın karbapenemlere karşı dirençten sorumludur. Bu karbapenemazlar, Ambler moleküler sınıf A, B veya D'ye aittir [4]. Bu dirençlerin tespit edilmesinde altın standart olarak kabul edilen moleküler yöntemlerin hem duyarlılığı hem de özgüllüğü yüksektir. Fakat maliyetli olması, deneyimli personel

gerektirmesi, ekip ve donanıma ihtiyaç duyulması sebebiyle istenilen ölçüde kullanımı yaygınlaşmamıştır.

Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullanılan maliyeti uygun, kolay, erişilebilirliği yüksek olan fenotipik yöntemler de mevcuttur. Bu fenotipik yöntemler arasında; kombinasyon disk yöntemi, CarbaNP Testi ve türevleri, karbapenem inaktivasyon metodu mevcuttur [5]. İlk olarak 2015 yılında Karbapenem İnaktivasyon metodu [6] geliştirilirken, 2017 yılında CLSI tarafından da önerilen fenotipik testler arasında yer alan modifiye karbapenem inaktivasyon metodu [7] özgülüğü ve duyarlılığıyla dikkat çekmiştir. Günümüze kadar çeşitli modifikasyonları ile yapılan çalışmalar göz önüne alındığında bu testlerin verimliliğini arttırdığı görülmektedir.

Çalışmamızda klinik örneklerden izole edilen karbapenemaz dirençli 100 adet *K.pneumoniae* izolatında, karbapenemaz tespitinde kullanılan fenotipik yöntemlerden olan karbapenem inaktivasyon metodu ve modifikasyonlarını, altın standart yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile karşılaştırmayı ve performanslarını değerlendirilmeyi amaçladık.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* TARİHÇESİ VE TAKSONOMİSİ

1882 yılında Carl Friedlander, *Klebsiella pneumoniae*'yi ilk kez tanımladı. Bu bakteriyi pnömoni nedeniyle ölen kişilerin akciğerlerinden izole ettikten sonra kapsüllenmiş basil olarak tanımladı. Başlangıçta Friedlander'ın basil'i olarak adlandırılan bu bakteri, ancak 1886 yılında *Klebsiella* adını aldı [8]. *Klebsiella pneumoniae*'nin homolog DNA'lara sahip fakat farklı biyokimyasal özellikler sergileyen üç alt türü vardır, bunlar: *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp. ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp. rhinoscleromatis*'tir[9]. *K. pneumoniae*'nin taksonomisi, Tablo 2.1'de gösterilmiştir

Tablo 2. 1: *Klebsiella pneumoniae*'nin taksonomisi [10]

Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	Enterobacterales
Aile	Enterobacteriaceae
Cins	<i>Klebsiella</i>
Tür	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

#### 2.2. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*'NİN MORFOLOJİK YAPISI

Enterobacteriaceae ailesinin karakteristik niteliklerini içeren *K. pneumoniae*, hareketsiz, kapsüllü, spor oluşturmeyen ve  $1-2 \mu\text{m} \times 0,5-0,8 \mu\text{m}$  boyutlarında gram negatif bir basildir [11]. *K.pneumoniae* belirgin bir kapsül içerir; bu özellik bakterilerin Gram boyamada (geniş bir kapsülle çevrili büyük basiller) ve kültürde

(mukoid, sümüksü koloniler) nispeten kolay bir şekilde tanınmasını sağlar. Çeşitli seçici besiyerlerinde (Eosine Methylen Blue(EMB) agar, MacConkey agar) ve seçici olmayan besiyerinde (Kanlı agar) ürerler [12].

## **2.3 VIRULANS FAKTÖRLERİ**

### **2.3.1 Kapsül**

Kapsül, bakterinin etrafını saran ve yüzeyinde kalın bir fibröz yapı oluşturan, suşu özgü polisakkaritlerden oluşan hücre dışı matristir. *K. pneumoniae* tarafından üretilen kapsüller polisakkaritlere K antijenleri denir. Bu polisakkaritlerin *K. pneumoniae* suşuna bağlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, serolojik teknikler kullanılarak suşun tanımlanmasında kullanılır [13].

### **2.3.2 Lipopolisakkarit (LPS)**

Lipopolisakkarit, bakterinin dış membranında bulunan, Lipit A, Çekirdek polisakkaridi ve O-Antijeninden meydana gelir. *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonunda LPS'nin birincil rolü, kompleman bileşeni C3b'yi bakteri membranından uzağa bağlayarak membran saldırı kompleksi C5b-9'un oluşumunu önleyerek bakteri hücrelerinin kompleman aracılı lizisine karşı koruma sağlamaktır [13].

### **2.3.3 Fimbria**

Fimbria, bakterinin konakçı yüzeylere yapışmasında rol oynar. *Klebsiella pneumoniae* tarafından iki ana fimbria türü sergilenir: ipliksi olan tip 1 fimbria ve sarmal benzeri şekle sahip olan tip 3 fimbria. Ayrıca her türün ifade düzeyi, bakterilerin tutunduğu yüzeye bağlı olarak değişmektedir. Tip 1 fimbrialar idrar yolunda ve mesanede eksprese edilir, ancak gastrointestinal sistem veya akciğerlerde eksprese edilmez. Tip 3 fimbrialar hücre dışı matrislere bağlanır ve biyofilmlerin oluşumu için önemlidir [13].

### 2.3.4 Siderofor

Son olarak *K. pneumoniae*'nin enfeksiyon esnasında gelişebilmesi için bulunduğu çevreden demir alması gerekir. Enfeksiyon esnasında memeli konakçılarda çok az serbest demir bulunur, bu nedenle bakterinin sideroforları eksprese etmesi gerekir. Bunlar, transferrin gibi memelilerdeki demir taşıma moleküllerine göre demire daha yüksek afiniteye sahip olan ve bakterinin hızlı büyümesini sağlayan moleküllerdir. *K. pneumoniae* tarafından eksprese edilen birincil siderofor, patojenik suşlardan da eksprese edilen enterobactin'dir; ancak salmochelin, yersiniabactin, colibactin ve aerobactin de eksprese edilebilir. Gerçekte, *K. pneumoniae*'nin hipervirülent suşları birden fazla siderofor eksprese edebilmektedir ve özellikle salmochelin, yersiniabactin, kolibactin ve aerobactin ekspresyonu ile ilişkilidir [13].

## 2.4 KLİNİK ÖNEMİ VE EPİDEMİYOLOJİSİ

*Klebsiella pneumoniae*, klinik örneklerden sıkça izole edilen bir bakteridir ve genellikle primer pnömoniye yol açar. %1-6 gibi nadir durumlarda, normal bireylerin orofarenksine kolonize olabilir. Gastrointestinal *K.pneumoniae* taşıyıcılığı ülkeler arasında değişmekte ve ortalama olarak %40 ile %66 arasında bulunmaktadır. Yüksek gelirli ülkelerde ise bu oran %5 ile %35 arasındadır. Hastaneye yatışın *K.pneumoniae* taşıyıcılığını artırdığı biliniyor olsa da hastanelerden rapor edilen *K.pneumoniae* taşıyıcılığı, prevalansından daha yüksektir[14]. *K.pneumoniae* nin neden olan pnömoni, toplum kaynaklı veya hastane kaynaklı pnömoni olarak ayrılabilir. Toplum kaynaklı pnömoni oldukça yaygın bir teşhis olmasına rağmen, *K.pneumoniae* enfeksiyonu nadirdir. Gelişmiş ülkelerde, toplum kaynaklı pnömoninin yaklaşık %3 ila %5'inin *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonla ilişkili olduğu tahmin edilmektedir, ancak Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde bu oran tüm pnömoni vakalarının yaklaşık %15'ini oluşturabilir. Genel olarak, *K.pneumoniae* dünya genelinde tüm hastane kaynaklı pnömonilerin yaklaşık %11,8'ini oluşturur [8].

*K.pneumoniae* 'nin yüksek prevalansı ve dünya çapında yaygın olmasının yanı sıra antibiyotik direnci de önemli bir sorundur. Ülkeler arasında değişen veriler, *K. pneumoniae*'nin tüm antibiyotik sınıflarına, özellikle de tedavi de son seçenek olarak kullanılan karbapenemlere duyarlılığının azaldığını göstermektedir [15]. 2020 yılı

CAESAR raporunda, Türkiye için antibiyotiklere karşı direnç oranlarında *K. pneumoniae* izolatlarında imipenem/meropenem direnci %39 iken ertapeneme karşı direnç oranının ise %51 dir [16].

## 2.5 ANTİBAKTERİYEL İLAÇLAR

20. yüzyılın en önemli tıbbi ilerlemelerinden biri penisilin keşfidir. 1928 yılında Alexander Fleming, bir *Penicillium notatum* türünün bakterileri öldürebilen madde ürettiğini gözlemledi. Penisilin'in keşfi ve tedavide kullanılacak kadar yeterli saflıkta üretilmesi, modern antibiyotik çağının başlangıcını müjdelemiştir. Antibiyotikler, bazı temel hücresel süreçleri engellemek veya durdurmak amacıyla tasarlanmıştır, bu yolla bakterilerin büyümesini kontrol altına alır veya onları tamamen öldürür. Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre ana sınıflar halinde gruplandırılır. Bunlar;

1. Hücre duvarı sentez inhibisyonu (Beta laktamlar, glikopeptitler, lipopeptitler, polipeptitler, izoniyazid, etiyonamid, etambutol, sikloserin)
2. Protein sentezi inhibisyonu (Aminoglikozidler, tetrasiklinler, glisilsiklinler, oksazolidinonlar, kloramfenikol, makrolidler, ketolidler, klindamisin, streptograminler)
3. Nükleik asit sentez inhibisyonu (Kinolonlar, rifampin ve rifabutin, metronidazol)
4. Antimetabolitler [17]

Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları ve etki spektrumları Tablo 2.2 de gösterilmiştir [12].

Tablo 2.2. Antibakteriyel ilaçların etki mekanizmaları ve etki spektrumları

1. HÜCRE DUVARI HASARI		
Etki Mekanizması	Antibiyotik	Etki Spektrumu
-Peptidoglikan sentezinden sorumlu proteinlere(PNP) ve enzimlere bağlanır	-Doğal penisilinler (penisilin G, penisilin V)	-Tüm $\beta$ -hemolitik streptokoklar ve diğer streptokokların çoğuna etkilidir; stafilokoklara karşı etkisi sınırlıdır; meningokoklara ve birçok gram pozitif anaeroba karşı etkindir; gram negatif basillere karşı etkisi zayıftır.
	-Penisilinaza dirençli penisilinler(metisilin, nafsilin, oksasilin kloksasilin, dikloksasilin)	Doğal penisilinlere benzer, farklı olarak stafilokoklara karşı artmış etkinliğe sahiptir.
	-Geniş spektrumlu penisilinler (ampisilin, amoksisilin)	Gram pozitif koklara karşı doğal penisilinlerle aynı etkiyi gösterir; bazı gram-negatif basillere karşı etkilidir.
	Dar spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler(sefalekssin sefalotin, sefazolin, sefapirin, sefradin)	Gram pozitif bakterilere karşı oksasilinle aynı etkiyi gösterir; bazı gram negatif basillere karşı etkilidir.
	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve sefamisinler (sefalekssin, sefalotin, sefapirin, sefradin)	Gram pozitif bakterilere karşı etki oksasiline eşittir; gram negatiflere karşı etkinlik Enterobacter, Citrobacter ve ayrıca Proteus türlerini de içerecek şekilde geliştirilmiştir.
	Geniş spektrumlu sefalosporinler (sefiksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefepim, sef- pirom)	Gram pozitif bakterilere karşı etki oksasiline eşittir; gram negatif bakterilere karşı Pseudomonas'ı da içerecek şekilde geliştirilmiştir.
	Karbapenemler(imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem)	Birçok aerop ve anaerop gram pozitif ve gram negatif bakteriye karşı etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.
	Dar spektrumlu monobaktam (aztreonam)	Belirli aerop gram negatif basillere karşı etkilidir; ancak anaeroplara ve gram pozitif koklara karşı etkisizdir.

β-laktamazlara bağlanır ve β-laktamın enzimatik inaktivasyonunu önler	β-laktamaz inhibitörü içeren penisilinler (ampisilin-sulbaktam, amoksisilin-klavulanat, tikarsilin-klavulanat, piperasilin-tozabaktam)	Aktiviteleri doğal penisilinlere benzer, ek olarak β-laktamaz üreten stafilocoklara ve belirli gram negatif basillere karşı da etkinlikleri geliştirilmiştir.
Peptidoglikan katmanların da çapraz bağlanmaları inhibe eder	Glikopeptitler(vankomisin)	Tüm stafilocoklar ve streptokoklara karşı etkilidir; enterokokların çoğuna, gram pozitif basillere ve tüm gram negatif bakterilere karşı etkisizdir.
Bakteriyel sitoplazma membranını ve peptidoglikan öncüllerinin taşınmasını inhibe eder.	Polipeptid(Basitrasin)	Stafilocoklar ve streptokoklara karşı etkilidir; gram negatif bakterilere karşı etkisiz.
Bakteri dış membranının geçirgenliğini bozar.	Polipeptid(kolistin)	Birçok gram negatif bakteriye karşı etkilidir, ancak gram pozitiflere karşı etkisi yoktur.
Mikolik asit sentezini inhibe eder.	İzoniyazid, etiyonamid	Mikobakterilere karşı etkilidir.

## 2. PROTEİN SENTEZİ İNHİBİSYONU

Etki Mekanizması	Antibiyotik	Etki Spektrumu
-Peptid zincirlerinin 30S ribozomdan olgunlaşmadan ayrılmasını sağlar.	Aminoglikozidler (gentamisin, streptomisin, kanamisin, tobramisin, amikasin)	-Başlıca gram negatif basillerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır; kanamisinin aktivitesi sınırlıdır; tobramisin Pseudomonas'a karşı gentamisinden biraz daha etkindir; en etkili olan amikasindir.
-30S ribozomda polipeptid uzamasını engeller.	Tetrasiklinler(tetrasiklin, doksisiklin, minosiklin)	-Gram pozitif ve bazı gram negatif bakteriler (Neisseria, bazı Enterobacteriaceae) mikoplazmalar, klamidyalar ve riketsiyalara karşı etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.

-30S ribozoma bağlanır ve protein sentezinin başlamasını önler.	Glisilsiklinler (tigesiklin)	-Spektrum tetrasiklinlere benzer fakat gram negatif bakterilere ve hızlı üreyen mikobakterilere karşı daha etkilidirler.
-50S ribozomda protein sentezinin başlamasını önler.	Oksazolidinon(Linezolid)	-Staphylococcus, Enterococcus, Streptococcus, gram pozitif basiller, Clostridium ve anaerob koklara karşı etkilidir; gram negatif bakterilere karşı etkisizdir.
-50S ribozomda polipeptid uzamasını engeller.	Makrolidler(eritromisin, azitromisin, klaritromisin, roksitromisin)	-Gram pozitif ve bazı gram negatif bakteriler, Neisseria, Legionella, Mycoplasma, Chlamydia, Chlamydophila, Treponema ve Rickettsia'ya karşı etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir; klaritromisin ve azitromisin bazı mikobakterilere karşı da etkindir.
	Linkozamid(klindamisin)	-Aerobik gram pozitif koklara ve anaeroplara karşı etkili geniş spektrumlu aktiviteye sahiptir.
	Streptograminler(dalfopristin kinupristin)	-Primer olarak gram pozitif bakterilere karşı etkindir; metisiline duyarlı ve dirençli stafilokoklar, streptokoklar, E.faecium (Enterococcus faecalis'e etkisiz) Haemophilus, Moraxella ve anaeroplara karşı iyi aktivite gösterir; Enterobacteriaceae ve diğer gram negatif basillere karşı etkili değildir.

### 3.NÜKLEİK ASİT SENTEZİNİN İNHİBİSYONU

Etki Mekanizması	Antibiyotik	Etki Spektrumu
-DNA girazın $\alpha$ -alt birimine bağlanır.	-Dar spektrumlu kinolon (nalidiksik asit)	-Belirli gram negatif basillere karşı etkilidir; gram pozitiflere karşı aktif değildir.
	-Geniş (broad) spektrumlu kinolonlar(siprofloksasin, levofloksasin)	-Gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili geniş spektrumlu antibiyotiklerdir.
	-Genişletilmiş(extended) spektrumlu kinolon (moksifloksasin)	-Gram pozitif bakterilere karşı artmış etkinliği olan geniş spektrumlu antibiyotiktir; gram negatif basillere karşı etkinlik siprofloksasine benzer.
-DNA'ya bağımlı RNA polimeraza bağlanarak transkripsiyonu önler.	-Rifampin, rifabutin	-Mikobakterilere ve aerob gram pozitif bakterilere karşı etkilidir; gram negatiflere karşı aktif değildir.

-Bakteri DNA'sını parçalar.	-Metronidazol	-Anaerobik bakterilere karşı etkilidir; aerop ve fakültatif anaeroplara karşı etkin değildir.
-----------------------------	---------------	---

4.ANTİMETABOLİTLER		
Etki Mekanizması	Antibiyotik	Etki Spektrumu
-Dihidropteroat sentazı inhibe eder ve folik asit sentezini bozar.	-Sülfonamidler	-Geniş bir aralıktaki gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkilidir ve üriner sistem enfeksiyonlarında seçilecek ilaçtır.
-Dihidropteroat redüktazı inhibe eder ve folik asit sentezini bozar.	-Trimetoprim	
-Dihidropteroat redüktazı inhibe eder ve folik asit sentezini bozar.	-Dapson	-Mikobakterilere karşı etkilidir.

### 2.5.1 Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Peptidoglikan (murein), bakteri hücre duvarının benzersiz bir mukopolisakkarit bileşenidir. Peptidoglikan tabakası, N-asetil-D-glukozamin ve N-asetil-D-muramik asit'in sırayla dizilmiş disakkarit alt birimlerinden oluşur. Peptidoglikan biyosentezi dört ana aşamadan oluşur: 1. sitoplazmada öncül maddelerin sentezi. 2. lipidle bağlı öncül maddelerin sitoplazmik zarı geçişi. 3. glikan ünitelerinin hücre duvarına yerleştirilmesi. 4. transpeptidasyon bağlanması ve olgunlaşması. Hücre duvarı biyosentezinin en yaygın olarak kullanılan inhibitörleri olan  $\beta$ -laktamlar 3. ve 4. aşamalarda süreçlere etki ederler. Beta-Laktam grubu antibiyotikler, penisilinler, sefalosporinler, sefamisinler, karbapenemler, monobaktamlar ve beta laktamaz inhibitörleridir. Peptidoglikanın çapraz bağlanmasını sağlayan transpeptidaz-transglikozilaz enzimleri olan PBPlere bağlanarak etki gösterirler.  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin PBP'lere bağlanmasını ve transpeptidasyon reaksiyonunun inhibe edilmesini kolaylaştırarak bakteriyel lizis ve hücre ölümüne neden olurlar.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler Tablo 2.3 de gösterilmiştir[18]

Tablo 2.3 Beta Laktam grubu antibiyotikler

Sınıf	Alt sınıf	Kategori	Antibiyotikler
Penemler	Penisilin	Penisilinaza Duyarlı	Penisilin G, Penisilin V
		Penisilinaza Dirençli	Metisilin, Oksasilin
		Geniş Spektrumlu	Karbenisilin, Tikarsilin
		Aminopenisilinler	Piperasilin
		Antipsödomonaller	Amoksasilin Klavulanat
		Genişletilmiş Spektrumlu	Ampisilin Sulbaktam
		Penem- $\beta$ -laktamaz kombinasyonları	
Sınıf	Alt sınıf	Kategori	Antibiyotikler
Sefemler	Sefalosporin 1	Dar spektrum, 1. Kuşak	Sefazolin, Sefalotin
	Sefalosporin 2	Genişlemiş spektrum, 2. Kuşak	Seforoksim, Sefonisid
	Sefalosporin 3	Geniş spektrum, 3. Kuşak	Seftazidim, Sefoperazon
	Sefalosporin 4	Genişletilmiş spektrum, 4. Kuşak	Sefepim
	Sefamisin		Sefmetazol, Sefoksitin
	Oksasefem		Moksalaktam
	Karbasefem		Lorakarbef

Sınıf	Alt sınıf	Kategori	Antibiyotikler
Karbapenemler			İmipenem, Meropenem, Ertapenem, Doripenem
Monobaktam			Aztreonam

## 2.6 ANTİBİYOTİK DİRENÇ MEKANİZMALARI

Antibiyotik direncinin artması ve yayılması hem bilim hem de hasta bireyler için benzersiz bir zorluk teşkil etmektedir. Enfeksiyon sadece bireyleri değil toplumları da tehdit eden bir hastalıktır. Antibiyotiklere dirençli patojenlerin ortaya çıkması ve dirençli organizmaların yayılması insan sağlığı açısından tehdit oluşturmaktadır.

Kronik enfeksiyonlardaki artış ayrıca zorluk teşkil etmekte olup; bu hastalıkların antibiyotiklere direnci nedeniyle tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır [19]. Antibiyotiklere karşı direnç, bakteriler tarafından üç temel mekanizmada gelişmektedir;

1. Antibiyotiğe karşı hücre duvarı geçirgenliğinde azalma ve hedefe ulaşmasının engellenmesi,
2. Antibiyotiğin enzim ile parçalanması veya değiştirilmesiyle etkisiz hale getirilmesi,
3. Antibiyotiğin hedef reseptör bölgesinde değişiklik meydana gelmesi [17]

Bu direnç mekanizmaları dahil olmak üzere, çoğu bakteri neredeyse her türlü direnç mekanizmasına sahiptir ve tek bir bakteride birden fazla direnç mekanizmasının bulunabileceği de unutulmamalıdır.

### **2.6.1 Beta Laktam Grubu Antibiyotiklerin Direnç Mekanizmaları**

Beta-laktam antibiyotikler PBP'lere saldırır ve hücre duvarı sentezine müdahale eder. Beta-laktamazların üç boyutlu konfigürasyonu PBP'leri taklit eder. Bu nedenle beta-laktamazlar, PBP'lerin yerine beta-laktam antibiyotiklere bağlanabilir ve bunları etkisiz hale getirebilir. Beta-laktam antibiyotikler bazı mikroorganizmaların doğal ürünleridir. Bu nedenle doğada, insanlık tarihinden önce bile mikroorganizmalar beta-laktamaz üretmiş ve antibiyotik üreticilerine karşı hayatta kalmıştır. Bu enzimler, beta-laktam antibiyotiklerin üretimi ve tüketiminden önce nadir bulunuyordu. Antibiyotiklerin yaygın kullanımının neden olduğu yoğun seçici baskı, beta-laktamazların özellikle gram-negatif bakteriler arasında evrimleşip yayılmasını sağlamıştır. Bu senaryo, yeni antibiyotiğin spektrumu ne kadar geniş olursa olsun, her yeni beta-laktam antibiyotiğin keşfinden kısa bir süre sonra tekrarlandı. Artık gram negatif bakteriler aynı anda çeşitli beta-laktamazlar üretiyor ve birçok beta-laktam antibiyotik sınıfına direnç kazandırıyor [20].

Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları Tablo 2.4'te vermiştir [21].

Tablo 2.4. Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları

TEMEL DİRENÇ MEKANİZMASI	ÖZEL DİRENÇ MEKANİZMASI
-Penisilin bağlayan proteinlerde değişim	-PBP'lerin beta-laktamlara bağlanma afinitesini azaltan değişiklikler -Hücrede bulunan PBP'lerde değişim; -Yakın türlerden transformasyon ile gen aktarımı ve homolog rekombinasyon ile mozaik gen oluşumu -PBP genlerinde nokta mutasyonu -Yeni PBP yapımı
-Beta Laktam antibiyotiği parçalayan enzim (Beta Laktamaz) üretimi	-Beta Laktamaz üretiminin artırılması -Mutasyon veya genetik aktarım -Beta Laktamaz kontrol mekanizmalarının bozulması -Varolan beta-laktamazlarda etki spektrumu değiştirecek mutasyonların oluşması -TEM-1, TEM-2, SHV-1 beta laktamaz genlerinde nokta mutasyonları ile GSBL sentezi -Gen aktarımı ile yeni beta-laktamaz genlerinin kazanılması
-İlacın hücredeki etkin konsantrasyonunun azaltılması	-İlacın girişinin azalması (porin protein değişimi veya kaybı) -İlacı dışarı atan aktif pompa sistemleri

## 2.6.2 Karbapenem Direnci

Karbapenemlere karşı direnç tipik olarak iki ana mekanizmadan kaynaklanır.

1. Yapısal mutasyonlarla birleşen  $\beta$ -laktamaz aktivitesi
2. Karbapenem antibiyotiklerini hidrolize eden enzimler olan karbapenemazların üretimi.

İlk mekanizma, genellikle plazmidler tarafından kodlanan genişlemiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazları (ESBL'ler) ve Enterobacteriaceae'deki ekspresyonun çoğunlukla

indüklenebilir veya baskılanmamış kromozomal genlerden enzimlerin aşırı üretimi ile ilişkili olduğu AmpC sefalosporinazları (AmpC) içerir. ESBL'ler ve AmpC, GNB (Gram Negatif Bakteri)'nin dış zarındaki bir protein ailesi olan ve değiştirildiğinde veya kaybolduğunda antibiyotiklerin bakteri zarı boyunca difüzyonunu kolaylaştıracak kadar yavaş bir hızla geciktirebilen porinlerin mutasyonu ile birleştirildiğinde karbapenem direncini kazandırma kapasitesine sahiptir. ESBL ve AmpC enzimlerinin etkisi. GNB'de karbapenem direnciyle ilişkili diğer mekanizmalar arasında ilaç akış pompaları ve penisilin bağlayıcı proteinlerdeki değişiklikler yer alır. Karbapenemaz üretiminin bir sonucu olan enzim hidrolizi, karbapenem direncinin bir başka nedenidir. Karbapenemazlar fonksiyonel yapılarına ve moleküler yapılarına göre sınıflara ayrılır. Bu sınıflandırma Tablo 2.5' te verilmiştir [22].

Tablo 2.5 Karbapenemazların Sınıflandırılması

Ambler Sınıflandırması	A	B	D
Bush-Jacoby Sınıflandırması	2f	3	2d
Enzim Aktif Bölge	Serin	Çinko	Serin
İnhibitör	Ticari $\beta$ -laktamaz inhibitörleri	EDTA	NaCl
Plazmid Kaynaklı	KPC, GES	VIM, IMP, NDM	OXA-48, OXA-181
$\beta$ -laktamlara etkinliği	Tüm beta laktamlara etkili(GES hariç)	Aztreonam hariç tüm beta laktam- lara etkili.	Karbapenemlere zayıf, Penisilinlere kuvvetli etki

### 2.6.2.1 Sınıf A Karbapenemazlar

Sınıf A karbapenemazlar serin bazlı ve çok yönlü hidrolitik kapasiteye sahip  $\beta$ -laktamazlardır. Sınıf A karbapenemazlar sefalosporinler, penisilinler, karbapenemler ve aztreonam dahil olmak üzere çok çeşitli  $\beta$ -laktamları hidrolize etme yeteneğine sahiptir. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilmesinden dolayı  $\beta$ -laktamazların grup 2f fonksiyonel alt grubuna yerleştirir. Bu sınıflandırmada bulunan NmcA (non-metallokarbapenemase-A), SME-1(Serratia marcescens enzyme), IMI-1 (Imipenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamase) kromozomal kodlanırken, KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase), GES ( Guiana extended spectrum) ise plazmidle kodlanır.

KPC (“Klebsiella pneumoniae carbapenemaz”) için karbapenemazları diğer fonksiyonel grup 2f enzimlerinden ayıran iki özellik vardır. İlk olarak KPC enzimleri plazmidler aracılığıyla aktarılırken; ikincisi substrat hidroliz spektrumu, sefotaksim gibi aminotiyazoloksim sefalosporinlerini içerir. KPC ailesinin ilk üyesi,1996 yılında Kuzey Carolina'daki bir K. pneumoniae klinik izolatında ICARE sürveyans projesi aracılığıyla keşfedilmiştir. Bu izolat test edilen tüm  $\beta$ -laktamlara dirençliydi ancak karbapenem MİK'leri klavulanik asit varlığında azaldı. İlk olarak bir biyoanalizle tespit edilen karbapenemaz aktivitesi, KPC-1 beta-laktamazı kodlayan büyük bir plazmid ile ilişkilendirildi. Amerika Birleşik Devletleri'nin doğu kıyısı boyunca KPC sınıfı karbapenemazların hızla yayılmasının ardından dünya çapında raporlar ortaya çıkmaya başladı [23]. Amerika Birleşik Devletleri dışında KPC üreten ilk K. pneumoniae vakası Fransa'dan bildirildi. İlerleyen zamanlarda KPC üreten K. pneumoniae suşlarının İsrail, Kolombiya, Çin ve Yunanistan'dan bildirilmiştir. Günümüzde ise KPC izolatlarına bağlı salgınlar Dünya'nın birçok yerinden bildirilmektedir. En endişe verici olanı, KPC'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi, çoklu ilaca dirençleri nedeniyle son derece zordur ve bu da yüksek ölüm oranlarına neden olur [23,24].

### 2.6.2.2 Sınıf B Karbapenemazlar

Hem yapısal hem de işlevsel olarak benzersiz bir  $\beta$ -laktamaz grubu olan metallo- $\beta$ -laktamazlar (MBL'ler), genellikle klinik izolatlarda ikinci veya üçüncü bir  $\beta$ -laktamaz

ile kombinasyon halinde üretilir. Aktif bölgede çinko iyonuna ihtiyaç duymaları nedeniyle yapısal olarak diğer  $\beta$ -laktamazlardan farklıdır. Serin  $\beta$ -laktamazların aksine, MBL'lerin monobaktamlara karşı afinitesi veya hidrolitik kapasitesi zayıftır. Klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. Bunun yerine daimin tetraasetik asit (EDTA) dipikolinik asit gibi metal iyon şelatörleri tarafından inhibe edilirler [25]. MBL'yi kromozomal olarak kodlayan bakteriler arasında *B. cereus* (BC II), *Bacillus anthracis*, *S. maltophilia* (L1), *Aeromonas Hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningoceptum* (BlaB veya GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormannii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), *Myroides* spp. (TUS-1, MUS-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) ve *S. fonticola* (SFH-1). Plazmid aracılığıyla aktarılanlar ise IMP (imipenemase metallo beta lactamase), VIM (Verona integron encoded metallo beta lactamase) ve NDM (New Delhi metallo beta lactamase)'dir [26].

Plazmid aracılığı ile aktarılan IMP, 1988 yılında Japonya'da *P. aeruginosa* GN17203 suşu'nun keşfedilmesiyle tespit edilmiştir [27]. Üç yıl sonra, Japonya'nın Okazaki kentindeki Aichi Hastanesi'nde bir idrar yolu enfeksiyonundan izole edilen *Serratia marcescens* Tn9106 suşunda aynı gen bulundu [28]. VIM-1 ilk olarak Verona, İtalya'da bir *P. aeruginosa* izolatından tanımlandı. 1997'deki bu klinik izolat, aralarında piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam'ın da bulunduğu bir dizi beta-laktamlara dirençliydi. Özellikle imipenemin MİK değeri  $>128 \mu\text{g/ml}$  idi. Bu suştan gerçekleştirilen biyokimyasal analiz sonucunda, EDTA tarafından inhibe edilen ve  $\text{Zn}^{2+}$  ilavesi üzerine eski haline dönen bir karbapenem hidrolize edici aktivite ortaya çıkardı [28,29]. IMP ve VIM daha sonra Dünya geneline yayılmış olup Japonya, Çin ve Tayvan kuşağında daha sık görülür [26]. Yeni Delhi metalo- $\beta$ -laktamaz 1 (NDM-1) tarafından sağlanan karbapenem direncine sahip Gram-negatif Enterobacteriaceae, potansiyel olarak büyük bir küresel sağlık sorunudur. NDM enzimleri ilk olarak İsveç'te 2008 yılında, daha önce New Delhi-Hindistan seyahat öyküsü olmuş hastanın idrar örneğinde *K. pneumoniae* suşu saptanmıştır [30]. Hindistan'ın Yeni Delhi kentindeki hastaneye kabul edildikten sonra İsveç'e geri gönderilen hasta, in vitro bakteri türleri arasında kolayca aktarılan, değişen boyutlardaki plazmitlerde bla NDM-1 ile *K. pneumoniae* ve *Escherichia coli* tarafından kolonize olduğu tespit edilmiştir NDM-1 karbapenemazlı

Enterobacteriaceae, birçok antibiyotik sınıfına karşı oldukça dirençlidir ve potansiyel olarak Gram-negatif enfeksiyonların tedavisinde ana antibiyotik sınıfları olan  $\beta$ -laktamlar, florokinolonlar ve aminoglikozidlerle tedavi, onun habercisidir. Yapılan çalışmalarda yalnızca tigesiklin ve kolistine duyarlı kalmıştır. NDM enzimi Hindistan ve alt kıtasında bulunan ülkelerden ve yoğun göç alan İngiltere gibi göçmen nüfusuna sahip ülkelere sıklıkla bildiriler yapılmaktadır [31]. NDM Türkiye’de Ekim 2011’de İstanbulda bulunan bir hastanenin hematoloji ünitesine başvuran bir hastanın kan kültüründen çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae*’den izole edilmiştir [32].

### 2.6.2.3 Sınıf D Karbapenemazlar

D-sınıfı beta-laktamazlar, "oksasilinazlar" için OXAs olarak adlandırılır, 232 enzimi içerir, bazı varyantların karbapenemaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir. OXA-163 adlı bir varyantın dışında D-sınıfı beta-laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etmezler. Genel olarak, D sınıfı beta laktamazların karbapenemaz aktivitesi zayıftır. Biyokimyasal karakterizasyonu klavulanik asit ve EDTA ile inhibe olmayıp sadece NaCl ile inhibe olurlar [33]. Karbapenemaz aktivitesine sahip ilk OXA  $\beta$ -laktamaz Paton ve ark. tarafından tarif edilmiştir. Enzim, 1985 yılında Edinburgh, İskoçya'daki bir hastadan izole edilen çoklu ilaca dirençli bir *A. baumannii* türünden saflaştırıldı [34]. Ancak 2001 yılında İstanbul'daki bir hastadan karbapenem direnci de dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli olduğu tespit edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatu elde edildi. Bu izolatta yeni bir OXA tipi  $\beta$ -laktamaz tanımlanmış ve OXA-48 olarak adlandırılmıştır. Bu enzim ve varyantları artık oldukça yaygındır. *A. baumannii*'de de rapor edilmiştir ve son yıllarda karbapenem direncinde endişe verici durumlardan birini temsil etmektedirler [35].

## 2.7 TÜRKİYE’DEKİ KARBAPENEMAZ EPİDEMİYOLOJİSİ

Türkiye tespit edilen ilk karbapenemaz direnci, Eylül 2001’de, İstanbul Çapa Hastanesi’nde idrar yolu enfeksiyonu ve cilt yanıkları olan 54 yaşındaki bir erkek hastanın idrar yolundan izole edilen *K. pneumoniae* 11978 suşudur [36]. 2003 yılında Elazığ’dan bildirilen lumbosakral menenjitomiyelozel ve santral sinir sistemi malformasyonu olan bir yenidoğanın beyin omurilik sıvısı kültüründen karbapeneme

dirençli *P. aeruginosa* izole edilmiştir [37]. Toraman ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada karbapenem direnci olarak saptanan suşların MBL üretim sıklığını, psödomonalar için %24, acinetobakterler için %21 olarak bulmuşlardır [38]. Bahar ve arkadaşları Ocak 2003'te Ankara SSK Eğitim Hastanesi'nde kalp-damar ameliyatı geçiren 53 yaşındaki bir hastanın solunum yolundan VIM-5 tipi metalo- $\beta$ -laktamaz üreten *P. aeruginosa* izolatını raporlamıştır. Bu, Türkiye'den metalo- $\beta$ -laktamaz üreten *P. aeruginosa* izolatının ilk raporudur [39].

İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematoloji Bölümü'ne başvuran 1 yaşındaki nöroblastomlu çocuğunun kan kültüründe *K. pneumoniae* suşu (KP-6852) izole edilmiştir. İzole edilen suş tiplendirildiğinde enzimin IMP-1 sub-tipine ait olduğu belirlenmiştir. Böylece Türkiye'deki ilk IMP raporlanmıştır [40]. NDM tipi metalo beta-laktamazlara baktığımızda Demir ve ark.'ları yaptıkları çalışmada Enterobacteriaceae izolatlarında NDM-1 prevalansını %10,5 olarak tespit etmişlerdir [41]. Başka bir çalışmada İraz ve ark.'ları NDM-1 oranını %19 olarak tespit etmişlerdir [42]. Heydari ve ark. çalışmasında Eylül 2014'te akut böbrek yetmezliği ve kronik gastrit nedeniyle hastaneye kaldırılan 49 yaşında Suriyeli bir kadının trakeal aspirat örneğinden bla NDM-1 taşıyan *Acinetobacter baumannii* ST85 izole edilmiştir. İlgi çekici olan, bla NDM-1 taşıyan izolatlarının, yakın zamanda Lübnan ve Fransa'da bla NDM-1 genini taşıyan *A. baumannii*'de tespit edilen, dünya çapında nadir görülen bir ST olan ST85'e ait olmasıdır [43]. Karbapenemaz direnç genlerinin yayılımı azalmadan devam etmektedir. Dünyada tespit edilen çoklu direnç genlerinin ülkemizde de görülmesi endişe vericidir. Nitekim 2015 yılında yapılan başka bir çalışmada tespit edilen OXA-48 ve NDM'yi birlikte üreten ilk *K.pneumoniae* bunu doğrulamaktadır [44]. Ülkemizde A sınıfı karbapenemazlardan biri olan KPC enziminin raporlanması 2014 yılında yapılmıştır. Romanya'daki bir hastaneden nakledilen ve İstanbul'a yakın bir hastanenin Yoğun Bakım Ünitesine kabul edilen 80 yaşında bir kadın hastanın tarama amacıyla alınan rektal sürüntüsünde de geniş spektrumlu  $\beta$  -laktamaz üreten *K. pneumoniae* üremiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bla KPC-2 geni tespit edilmiştir [45]. Türkiye'deki GES enzimini bildirimine baktığımızda 2010 yılında Belçika'ya transfer olmuş bir hastanın izolatında tespit edildiği görülmektedir [46]. 2013 yılında Cicek ve ark. çalışmasında, karbapenem dirençli *A. baumannii* suşlarının önemli bir kısmında GES-11 varlığını tespit etmişlerdir [47]. Yapılan çalışmalar ışığında ülkemizde karbapenem direnci her

geçen gün artmaktadır. Global bir sorun olmanın dışında ülkemizde de giderek büyüyen bir problem haline gelmektedir. Halk sağlığı kapsamında ele alınması, gerekli hassasiyet ve ciddiyet ile yaklaşılması gerekmektedir.

## **2.8 KARBAPENEMAZLARIN FENOTİPİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

### **2.8.1. Modifiye Hodge Testi**

MHT'nin klinik performans açısından sınırlılıkları, özgüllük eksikliği ve bakteri izolasyonundan sonra sonuçların elde edilmesindeki gecikme (24 ila 48 saat) gibi dezavantajlarının bulunmasıdır. Ayrıca test edilecek karbapenemazların türleri arasında duyarlılık değişkenlik göstermektedir [48]. MHT, CLSI'ın önerdiği tarihten (2014) bugüne kadar çeşitli modifikasyonlara uğrasa da CLSI'ın 2018 güncellemesinde kullanılmaması önerilmiştir [49].

### **2.8.2 Kombine Disk Yöntemi**

Karbapenem ve karbapenemaz inhibitörlerinin sinerjisi temeline dayanan bu test kolay, ucuz, laboratuvar koşullarında erişilebilir olması, karbapenemazın varlığı ve türü hakkında bilgi vermesi nedeniyle rutinde tercih edilebilen bir testtir [50].

### **2.8.3 Karbapenem İnaktivasyon Metodu**

Karbapenemaz aktivitesinin kolay ve hızlı tanımlanmasını sağlayan fenotipik testtir. Bu yöntemin, inkübasyon sıcaklığı veya süresi, disk üreticisi, laboratuvar personeli, kültür veya bakteri süspansiyonunun süresi gibi değişkenlerden etkilenmemesi, uygun maliyetli ve basit olması gibi avantajları bulunmaktadır [6]. Çalışmamızda Karbapenem İnaktivasyon metodu ve modifikasyonlarından bir sonraki bölümde detaylıca bahsedilecektir.

#### **2.8.4. Biyokimyasal yöntemler**

Karbapenemaz varlığının iki saatin altında ve düşük maliyetle tespit edilmesi için geliştirilen, karbapenem hidrolizi sonucunda pH'da meydana gelen değişikliklerin indikatör maddeler kullanılarak saptanmasını sağlayan biyokimyasal bir yöntemdir. Fenol kırmızı bazlı Carba NP (Karbapenemase Nordmann-Poirel) testi ve bromtimol bazlı Blue-Carba testi bu prensiple çalışan testlerdir [50]. Nordmann ve ark. yaptıkları çalışmada CarbaNP testinin özgülüğünü ve duyarlılığını %100 bulmuşlardır [51]. Başka bir çalışmada Tijet ve ark. testin duyarlılığını %80'nin altında tespit etmişlerdir [52]. Yine farklı bir çalışmada Mitra ve ark. da testin duyarlılığını düşük tespit etmiştir [53]. Bu durumun OXA-48, GES gibi karbapenem hidroliz etkisi zayıf enzimlerden kaynaklandığını düşünmüşlerdir.

#### **2.8.5 İmmunokromatografik yöntemler**

Kromatografik kağıda sabitlenmiş monoklonal antikorlar ile test edilecek örnekteki antijenin birleşmesi sonucu ortaya çıkan immunkomplekslerin renk değişimi olarak tanımlanır. Pasteran ve ark. yaptıkları çalışmada immunokromatografik testin duyarlılık ve özgülüğünü %100 tespit etmişlerdir [54]. Glupczynski ve ark. da aynı şekilde testin duyarlılık ve özgülüğünü %100 tespit etmişlerdir [55]. Başka bir çalışmada Notake ve ark. IMP enziminin hızlı saptanması için geliştirilen immunokromatografik testin duyarlılık ve özgülüğünü %100 tespit etmişlerdir [56]. Yapılan çalışmaları incelediğimizde ortaya çıkan sonuç; bu yöntem özel olarak belirlenmiş enzimi tespit etme hususunda oldukça başarılıdır.

#### **2.8.6 Kültür bazlı yöntemler**

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae riskli hastalar arasında hızlı bir şekilde yayılarak nozokomiyal enfeksiyonlara neden olmakta ve enfeksiyon kontrol programlarının bir bileşeni olarak rektal sürüntü sürveyansı önerilmektedir [57]. Bu sebeple Amerika Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (CDC) öneride bulunmuştur. Test edilecek rektal sürüntü 5 ml Triptik soy buyyon besiyerinin içerisinde bulunan 10 µg'lik karbapenem diski ile birlikte bir gece inkübasyona

bırakılır. İnkübasyon sonrası MacConkey agara ekim yapıp tekrar bir gece daha inkübe edilir. Değerlendirme esnasında laktoz pozitif koloniler karbapenemaz tespiti açısından ileri testler için işleme alınır [58].

### **2.8.7 Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI TOF MS)**

Bu yöntem, mikroorganizmaların ribozomal protein yapısının iyonlaşması ve protein profilinin ortaya çıkarılması sonucunda iyonize kütlelerinin elektrik alanından geçmesi prensibine dayanır [59]. Hrabák ve ark. yaptıkları çalışmada bu yöntemi 124 suşla çalışmış, özgüllüğünü 97.87 duyarlılığını ise %96.67 bulmuşlardır [60]. Papagiannitsis ve ark. yaptıkları çalışmada testin özgüllüğünü %100; duyarlılığını ise %76 tespit etmişlerdir. Çalışmanın devamında reaksiyon tamponuna amonyum bikarbonat ( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ ) ilave ettiklerinde testin duyarlılığını önemli ölçüde arttırdığını (%98) gözlemlemişlerdir [61]. Ghebremedhin ve ark. çoklu ilaca dirençli Enterobacteriaceae ile yaptıkları çalışmada bu testin duyarlılığını %96 olarak tespit etmişlerdir [62]. Gerçekleştirilmesi kolay olan bu analiz, zamandan tasarruf sağlar, uygun maliyetlidir, ayrıca kütle spektrometrisinin mevcut olması durumunda herhangi bir rutin laboratuvarında CPE'yi tespit etmek için kullanılabilir [63].

## **2.9 KARBAPENEMAZLARIN GENOTİPİK YÖNTEMLERLE TESPİTİ**

### **2.9.1 Polimeraz zincir reaksiyonu(PZR)**

1984 yılında Kary Mullis, polimeraz zincir reaksiyonu yöntemini bularak Nobel ödülünü almıştır. Spesifik DNA sekanslarının in-vitro DNA sentezi yoluyla çoğaltılabilen hızlı, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir tekniktir [64]. Fakat PZR'nin ana dezavantajları ise maliyetli olması, eğitilmiş personel gerektirmesi, özel ekipman, donanım gerektirmesi ve primeri olmayan enzimi saptayamaması gibi durumlar söz konusudur [65].

### **2.9.2 Oligonükleotid hibridizasyon yöntemi**

Bu yöntem bir örnekte birden fazla genin aynı anda tanımlanmasına imkan sağlar. DNA mikrodizisine dayanan hibridizasyon analizi yöntemi uygulama basamakları;

1. Test edilecek bakterinin DNA izolasyonu.
2. Karbapenemaz genlerinin amplifikasyonu,
3. Oligonükleotidler ile primerlerin hibridizasyonu
4. Hibridizasyon sonuçlarının kolorimetrik tespiti yapılır [66].

Naas ve ark. yaptıkları çalışmada; genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten bakterileri tanımlamayan bu test prensibiyle çalışan bir ticari kitle yapmış oldukları araştırmada özgüllük ve duyarlılık oranlarını %100 tespit etmişlerdir [67].

### **2.9.3 Klonal ilişkinin moleküler analizi**

Moleküler yöntemler bakteri direnç genlerinin tanımlanmasının yanı sıra epidemiyolojik çalışmalarda ve gen haritalanması gibi amaçlarla da kullanılır. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) yöntemi bunlardan birtanesidir. İlk kez Schwartzand ve Cantorand (1983) tarafından açıklanan bu teknik, yaygın jel elektroforezinden farklıdır. Elektrik akımının alternatif değişimiyle DNA'nın yürütülmesi prensibine dayanır. Bu yöntem vakaları ve görülme sıklığını belirlemek için değerli bir araç olmakla birlikte belirli hastalıkların prevalansında moleküler tiplendirme ve patojenlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalarda da kullanılmaktadır [68]. Tercih edilen diğer yöntem ise Multilokus sekans tipleme (MLST)dir. MLST'nin temel çalışma prensibi bakteri DNA'sındaki internal parçalarının, DNA' daki allellerini saptamaktır. Bölgesel ve küresel epidemiyolojik analiz ve klonal yayılma araştırmaları için son derece ayırıcı bir yöntemdir [69].

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METOD

#### 3.1. ÇALIŞMANIN ÖRNEKLEMİ

Çalışmamıza 2022-2023 tarihleri arasında Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na ve Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden (kan kültürü, trakeal aspirat, apse yara kültürü, katater kültürü, balgam kültürü, idrar kültürü) ve otomatize antibiyogram sistemiyle [Phoenix otomatize sistemi (Becton Dickinson and Company, ABD)] EUCAST 2023 kriterlerine göre, üç farklı karbapenem grubu antibiyotikten (imipenem, meropenem, ertapenem) en az birine dirençli olan 100 adet *K. pneumoniae* kökeni dahil edildi. Direnç tespit edilen bu izolatlar boncuk içeren kültür saklama tüplerine alınıp çalışma gününe kadar -20°C'de saklanmıştır. Her hastadan aynı anda gelen farklı klinik örneklerden tek bir suş çalışmaya dahil edilmiştir.

#### 3.2. ÇEŞİTLİ KLİNİKLERDEN GÖNDERİLEN ÖRNEKLERİN TOPLANMASI, İZOLASYONU

Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli kliniklerden gönderilen örneklerden, idrar numunelerinin ekimi %5 koyun kanlı agar ve EMB agar besiyerlerine, idrar dışı örneklerin ekimi ise kanlı agar, EMB agar ve çikolata agar besiyerlerine yapılmıştır. Ekim yapılan besiyerleri 24-48 saat 35°C'de etüvde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası konvansiyonel ve otomatize yöntemler ile değerlendirilip morfolojik olarak *K. pneumoniae* olduğu düşünülen (EMB agarda mukoid, S koloniler) koloniler ileri tanımlama işlemlerine alınmıştır.

### 3.3 ÇEŞİTLİ KLİNİKLERDEN GÖNDERİLEN ÖRNEKLERİN TANIMLANMASI VE KARBAPENEM DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

#### 3.3.1. BD Phoenix™ 100

Gram negatif bakteriler için kullanılan BD Phoenix 100 NMIC-ID ve UNMIC-ID panelleri mevcuttur. İdrar örnekleri için UNMIC-ID paneli, idrar dışı örnekler için ise NMIC-ID paneli kullanılmıştır. Kültür plağındaki saf kolonilerden alınıp Phoenix ID Broth tüpüne aktarılmıştır. Nefelometre yardımıyla 0.5 McFarland bulanıklık ayarlanmıştır. BD Phoenix AST sıvısı içeren tüpe 1 damla AST indikatörü eklenip, hazırlanmış olan bakteri süspansiyonlu ID Broth tüpünden 25 µL pipetlenmiştir. Elde edilen AST sıvısının kapağı kapatılıp birkaç kez alt üst edilmiştir. ID broth tüpü panelin ID doldurma portuna, AST broth sıvısı ise AST doldurma portuna tamamen dökülmüştür. Panellerin kapakları kapatılıp her bir kuyucuğun dolup dolmadığı kontrol edilmiştir. Hazırlanan paneller barkodları ve örnek numaraları cihaza tanımlanıp yüklenmiştir. Bakteri tanımlama ve antibiyotik duyarlılık işlemleri için 35.1°C’de 18-24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirilmiştir.

Laboratuvarlarımızda aylık standart suşlarla internal kontrol yapılmakta ve dış kalite kontrol programı çerçevesinde çalışılmaktadır.

#### 3.3.2. Gradyent Test

*K. pneumoniae* suşlarının %5 koyun kanlı agarda inkübasyonundan sonra saf kolonilerden 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyon hazırlanıp pamuklu eküvyon çubuk yardımıyla Müller Hilton Agara eşit şekilde pasajlanmıştır. Bakteri süspansiyonu kuruduktan sonra imipenem, meropenem ve ertapenem gradient test şeritleri (bioMérieux, France) yerleştirilmiştir. Daha sonra 35°C’de 16-24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası değerlendirme EUCAST 2023 kriterlerine göre yapılmıştır.

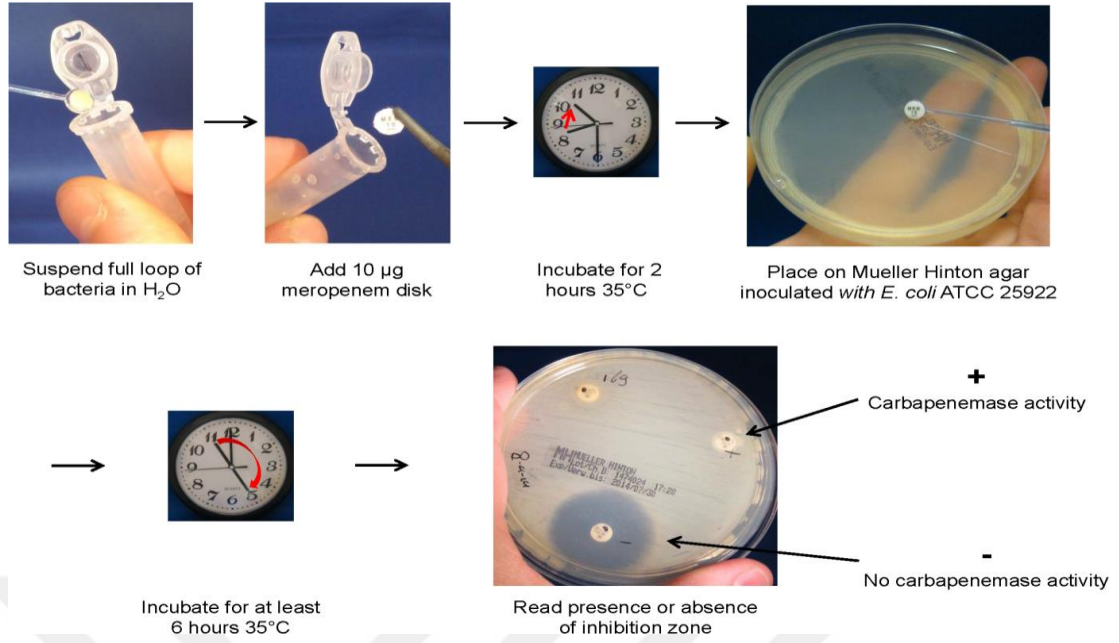
### 3.4. FENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ TESPİTİNİN YAPILMASI

BD Phoenix™ 100 otomatize sistemi ve gradient test ile sonuçları doğrulanan 100 *K. pneumoniae* suşu fenotipik yöntemler olan Karbapenem İnaktivasyon Metodu, Modifiye karbapenem inaktivasyon metodu, Basitleştirilmiş karbapenem inaktivasyon metodu ve Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu ile araştırılıp çalışılmıştır. Ayrıca çalışmamızda fenotipik testlerin kalite kontrolü amacıyla *K. pneumoniae* NCTC 13438 (karbapenemaz pozitif) ve *Escherichia coli* ATCC 25922 (karbapenemaz negatif) suşları kullanılmıştır.

#### 3.4.1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM)

Karbapenem inaktivasyon metodunun çalışma basamakları şu şekildedir;

1. Test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 10 µL koloni alınıp içerisinde 400 µL distile su bulunan steril endorf tüpüne eklenir.
2. Hazırlanan süspansiyonun içerisine 10 µg meropenem diski koyulur.
3. 36±1°C'deki etüvde 2 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası 10 µg meropenem diski alınarak, karbapenemaza duyarlı *E.coli* ATCC 25922 ile 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyon ile pasajlanmış Müller Hilton Agar besiyerine yerleştirilir.
5. Hazırlanan besiyeri 6 saat inkübasyona alınır.
6. Değerlendirme ise, bakteri karbapenemaz üretiyorsa meropenem diski inaktive olur ve sonuç pozitifdir. Eğer bakteri karbapenemaz üretmiyorsa meropenem diski duyarlıdır ve sonuç negatifdir.



Şekil 1. Karbapenem İnaktivasyon Metodu [6].

### 3.4.2. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu (mCIM)

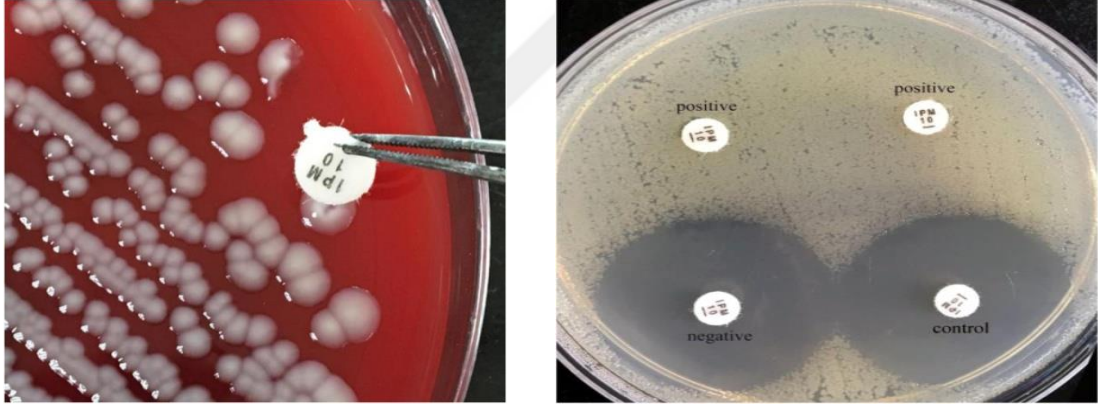
Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodunun çalışma basamakları şu şekildedir;

1. Test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen öze yardımıyla 1 µL alınıp, 2 mL Triptik Soy Buyyon besiyeri içeren tüpe aktarılır.
2. Hazırlanan süspansiyonun içerisine 10 µg meropenem diski koyulur.
3. 36±1°C'deki etüvde 4 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası 10 µg meropenem diski alınarak, karbapenemaza duyarlı *E.coli* ATCC 25922 suşu ile 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyon ile pasajlanmış Müller Hilton Agar besiyerine yerleştirilir.
5. Hazırlanan besiyeri 16-20 saat inkübasyona alınır.
6. Değerlendirme CLSI önerilerine uyularak yapılır. Rehberde meropenem diskinin çevresinde 6-15 mm inhibisyon zon çapı veya 16-18 mm inhibisyon zon çapı içerisinde tekli üreme tespit edilirse sonuç pozitif değerlendirilir. ≥19 mm inhinisyon zon çapı tespit edildiğinde ise sonuç negatiftir. Ayrıca ≥19 mm inhinisyon zon çapı içerisinde tekli üreme veya 16-18 mm inhibisyon zon çapı görülürse sonuç belirsiz olarak değerlendirilir.

### 3.4.3. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu (sCIM)

Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodunun çalışma basamakları şu şekildedir;

1. Serum Fizyolojik ve *E.coli* ATCC 25922 suşu ile 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyon, Müller Hilton Agar besiyerine pasajlanır.
2. Hazırlanan besiyeri 3-10 dk kurumaya bırakılır.
4. Test edilmek istenen bakterinin saf kültürüne imipenem diski sürülür ve hazırlanan Müller Hilton Agar besiyerine pens yardımıyla yerleştirilir.
5. Hazırlanan besiyeri 16-18 saat inkübasyona alınır.
6. İnkübasyon sonrası değerlendirme  $\leq 22$  mm inhibisyon zon çapı tespit edilirse sonuç pozitifdir.  $\geq 26$  mm inhibisyon zon çapı tespit edilirse sonuç negatifdir. Eğer 23-25 mm inhibisyon zon çapı tespit edilirse sonuç belirsiz olarak değerlendirilir.



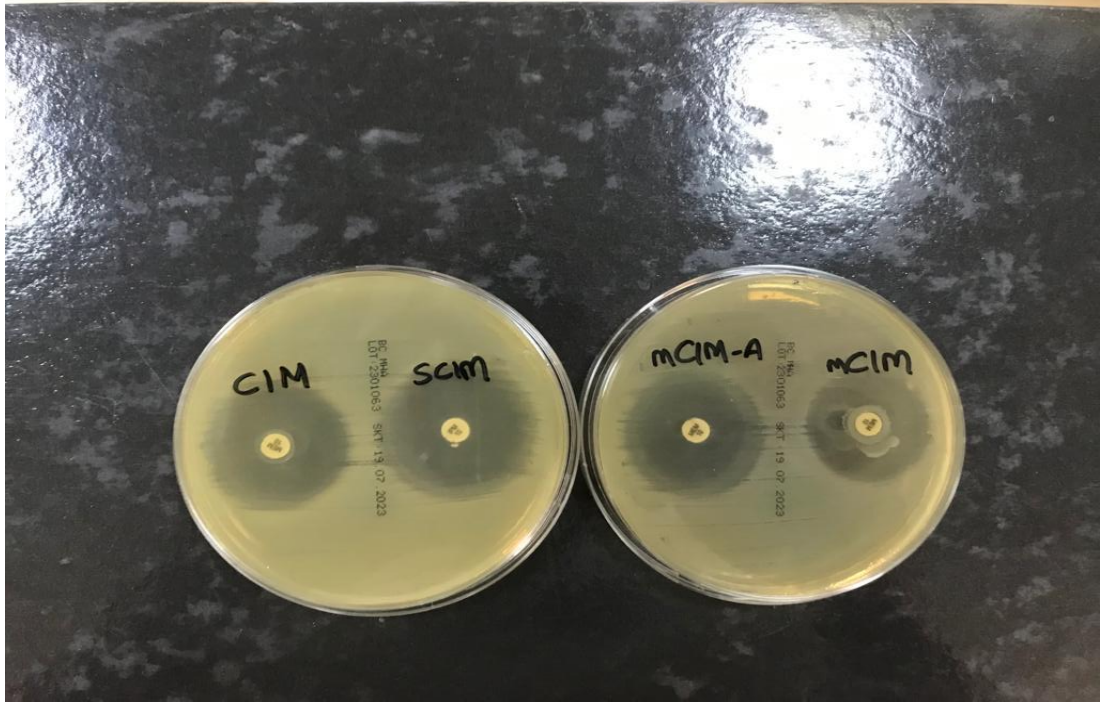
Şekil 2. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu [70]

### 3.4.4. Amonyum bikarbonat ilaveli Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu

Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodunun çalışma basamakları şu şekildedir;

1. Test edilmek istenen bakterinin saf kültüründen 1  $\mu$ L alınıp, 2 mL Triptik Soy Buyyon besiyeri içeren tüpe aktarılır.

2. Hazırlanan bakteri süspansiyonuna pH'sı 7.0 olan amonyum bikarbonat (Sigma A6141) son konsantrasyonu 50 mM olacak şekilde ilave edilir ve içerisine 10 µg meropenem diski koyulur
3. 36±1°C'deki etüvde 4 saat inkübe edilir.
4. İnkübasyon sonrası 10 µg meropenem diski alınarak, karbapenemaza duyarlı E.coli ATCC 25922 suşu ile 0.5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan süspansiyon ile pasajlanan Müller Hilton Agar besiyerine yerleştirilir.
5. Hazırlanan besiyeri 16-20 saat inkübasyona alınır.
6. İnkübasyon sonrası değerlendirmede <19 mm inhibisyon zon çapı gözlemlenirse sonuç pozitifdir. ≥19 mm inhibisyon zon çapı gözlemlenirse sonuç negatifdir.



Şekil 3. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve modifikasyonlarının karbapenemaz negatifliği



Şekil 4. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve modifikasyonlarının karbapenemaz pozitifliği

### 3.5. GENOTİPİK YÖNTEMLERLE KARBAPENEMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Moleküler yöntemlerden biri olan ve altın standart olarak kabul edilen Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile direnç genleri ve tiplendirmelerin yapılabilmesi için Karbapenem Direnci qPCR kiti (Bioeksen, Türkiye) kullanılmış ve ilgili işlem basamakları üretici firmanın önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

#### 3.5.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için test edilecek bakterilerin 18-24 saatlik inkübasyondan sonra saflaştırılmış koloniler 250 µL distile su içeren steril ependorflara alındı. Isı bloğunda 95°C' de 15 dk kaynatıldı. Ardından steril ependorflar 10000 rpm de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant kısımları PCR' da kullanılmak üzere ayrıldı.

### 3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu uygulama basamakları şu şekilde gerçekleştirildi;

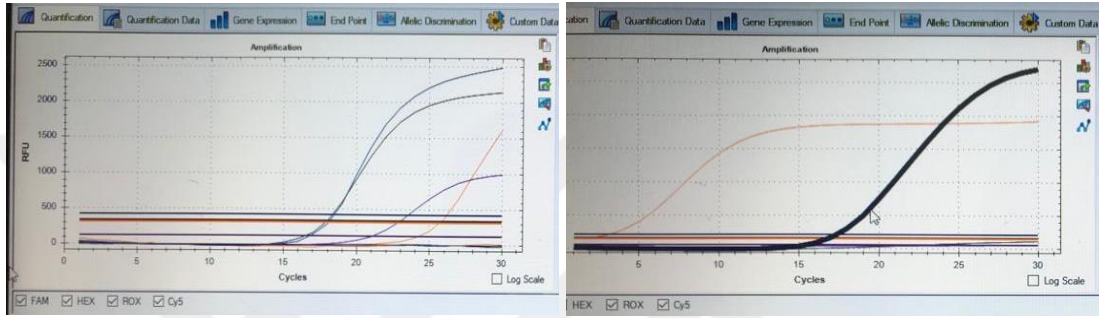
1. İşlem esnasında her bir bakteri örneği için toplam reaksiyon hacmi 10 µL olacak şekilde 8 kuyucuklu kapaklı strip tüpleri kullanıldı.
2. İlk kuyucuğa qPCR testi için optimize edilmiş kullanıma hazır mix olan 2XqPCR Mix'ten 5 µL, hedef bölgelerin spesifik amplifikasyonu (KPC, NDM, VIM, IMP) olan CRE Oligo Mix'ten 2.5 µL, izolasyonu yapılan bakteri DNA'sından 2.5 µL pipetlendi.
3. İkinci kuyucuğa qPCR testi için optimize edilmiş kullanıma hazır mix olan 2XqPCR Mix'ten 5 µL, hedef bölgelerin spesifik amplifikasyonu (OXA-51, OXA-23, OXA-58, OXA-48) olan OXA Oligo Mix'ten 2.5 µL, izolasyonu yapılan bakteri DNA'sından 2.5 µL pipetlendi.
4. Her bir çalışmada ortam kontaminasyonunun önlenmesi açısından negatif ve pozitif kontroller çalışıldı.
5. Pipetleme işlemleri bittikten sonra spin santrifüj edilip tablo 3.1'de gösterilen qPCR programına ayarlanmış real-time PCR cihazına yerleştirilmiş ve PCR reaksiyonu başlatıldı.

Tablo 3.1. qPCR Programı

qPCR Programı			
Basamak	Döngü Sayısı	Sıcaklık	Süre
Ters Transkripsiyon	1	52°C	3 dk
Bekleme	1	95°C	10 sn
Denatürasyon	12 Touch Down	95°C	1 sn
Bağlanma/Uzama	Döngüsü: Döngü başına bağlanma sıcaklığında 1°C azalma	67°C ile 56°C	15 sn
Denatürasyon	30	95°C	1 sn
Bağlanma/Uzama		55°C	15 sn
Tespit(Okuma)		FAM/HEX/ROX/CY5	

### 3.5.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Sonuçların değerlendirilmesinde öncelikle ilk olarak kontrollerin çalışıp çalışmadığı tespit edilmiştir. FAM/HEX/ROX/CY5 kanallarında elde edilen amplifikasyon eğrilerinin şekli ( Şekil 5), Cq değerleri tüm reaksiyon kuyuları için incelenmiştir. Kit içeriğinde yer alan karbapenem direnç genlerini (KPC, VIM, IMP, NDM, OXA-48, OXA23-58, OXA-51) taşıyıp taşımadığı değerlendirilmiştir



Şekil 5. Amplifikasyon(sigmoidal) eğrileri

### 3.6. İSTATİKSEL ANALİZ

Elde edilen bulguların veri analizi için SPSS for Windows version 20.0 paketi kullanılmıştır. Tanımlayıcı veriler yüzde olarak gösterilmiştir. Moleküler yöntem olan PCR sonuçları altın standart olarak kabul edilmiştir. Karbapenem İnaktivasyon Metodu, Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu, Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Amonyum bikarbonat ilaveli Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile karbapenemazları belirlemede özgüllük ve duyarlılık değerleri hesaplanmıştır

## BÖLÜM 4

### BULGULAR

Çalışmamıza, EUCAST 2023 rehberi karbapenemaz değerlendirme kriterleri göz önünde bulundurularak 100 adet *K. pneumoniae* izolatu dahil edilmiştir. 100 adet *K. pneumoniae* suşunun 50 adeti Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanırken diğer 50 adet suş ise Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanmıştır. İzolatların geldiği servislerin dağılımı Tablo 4.1. ve Tablo 4.2. de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. İzolatların geldiği Servisler

KARABÜK EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ		
Örneklerin Geldiği Yerler	Sayı (n)	Oran(%)
Yoğun Bakımlardan Gelen Örnekler	43	86
Servislerden Gelen Örnekler	6	12
Polikliniklerden Gelen Örnekler	1	2

Tablo 4.2. İzolatların geldiği Servisler

BALIKESİR ATATÜRK ŞEHİR HASTANESİ		
Örneklerin Geldiği Yerler	Sayı (n)	Oran(%)
Yoğun Bakımlardan Gelen Örnekler	26	52
Servislerden Gelen Örnekler	20	40
Polikliniklerden Gelen Örnekler	4	8

Tablo 4.1. ve Tablo 4.2. de görüleceği üzere gelen izolatların 69'u (%69) yoğun bakımlardan, 26'sı (%26) servislerden, 5'i (%5) i polikliniklerden gelmiştir.

Tablo 4.3. Karabük eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen izolatların numune türüne göre dağılımı

Numune Türü	Sayı (n)	Oran(%)
Kan Kültürü	18	36
Trakeal Aspirat	16	32
Apse Yara Kültürü	8	16
İdrar Kültürü	5	10
Katater Kültürü	2	4
Balgam Kültürü	1	2
TOPLAM	50	100

Tablo 4.4. Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen izolatların numune türüne göre dağılımı

Numune Türü	Sayı (n)	Oran(%)
İdrar Kültürü	17	34
Trakeal aspirat	12	24
Apse Yara Kültürü	9	18
Kan Kültürü	6	12
Balgam Kültürü	6	12

TOPLAM	50	100
--------	----	-----

Çalışmamızdaki izolatların büyük çoğunluğu sırasıyla Endotrakeal aspirat, kan ve idrar (%28, %24, %22) kültürü numunelerinden elde edilmiştir.

Tablo 4.5. Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen izolatların fenotipik yöntemlerle saptanan inhibisyon zon çapları ve direnç genleri

Bakteri türü	CIM	SCIM	MCIM	MCIM-A	PCR
1. K.P.	R	R	R	R	OXA-48+ KPC
2. K.P.	R	R	15	15	OXA-48
3. K.P.	R	18	15	15	OXA-48
4. K.P.	R	R	13	11	OXA-48
5. K.P.	R	R	14	16	OXA-48+ KPC
6. K.P.	R	R	15	11	OXA-48
7. K.P.	R	18	13	R	OXA-48
8. K.P.	R	15	15	13	OXA-48
9. K.P.	22	26	19	13	OXA-48+ KPC
10. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
11. K.P.	R	16	13	R	OXA-48
12. K.P.	R	R	13	13	OXA-48
13. K.P.	R	R	15	10	OXA-48
14. K.P.	21	20	15	18	OXA-48
15. K.P.	R	11	R	13	OXA-48
16. K.P.	22	26	15	15	OXA-51
17. K.P.	R	R	15	15	OXA-48
18. K.P.	R	19	16*	18	OXA-48
19. K.P.	R	20	15	14	OXA-48
20. K.P.	23	20	21	15	OXA-48
21. K.P.	R	R	R	16	OXA-48
22. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA 48

23. K.P.	R	20	19	16	OXA-48
24. K.P.	R	R	15	R	OXA-48
25. K.P.	R	R	15	17	OXA-48
26. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
27. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
28. K.P.	R	R	14	15	OXA-48
29. K.P.	R	R	R	R	OXA-48+ KPC
30. K.P.	R	R	15	10	OXA-48
31. K.P.	R	R	R	R	KPC
32. K.P.	R	21	15	R	OXA-48
33. K.P.	R	18	R	R	OXA-48
34. K.P.	R	R	R	R	KPC
35. K.P.	R	20	R	R	OXA-48+ KPC
36. K.P.	R	R	R	R	OXA-48+ KPC
37. K.P.	R	18	R	R	OXA-48+ KPC
38. K.P.	R	16	17*	R	OXA-48
39. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
40. K.P.	R	R	R	R	NDM+KPC
41. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
42. K.P.	R	R	R	15	OXA-48
43. K.P.	R	R	R	R	OXA-48+ KPC
44. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
45. K.P.	24	28	22	22	OXA-48
46. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
47. K.P.	R	R	R	R	OXA-48+ KPC
48. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM+OXA-48+OXA23-58
49. K.P.	R	17	R	R	KPC+NDM+OXA-48
50. K.P.	R	17	14	R	KPC+NDM+OXA-48

Tablo 4.6. Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen izolatların fenotipik yöntemlerle saptanan inhibisyon zon çapları ve direnç genler

Bakteri

Türü	CIM	SCIM	MCIM	mCIMA	PCR
1. K.P.	22	30	22	20	OXA-48
2. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
3. K.P.	R	R	16*	12	OXA-48
4. K.P.	18	R	R	R	OXA-48
5. K.P.	19	R	R	R	OXA-48
6. K.P.	18	26	20	16	KPC+OXA-51+OXA 23-58
7. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
8. K.P.	24	32	22	23	OXA-48+OXA 23-58
9. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
10. K.P.	R	R	R	16	OXA-48
11. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48+OXA 23-58
12. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
13. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA-48+OXA 23-58
14. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
15. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
16. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA 23-58
17. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
18. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM+OXA-48
19. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM+OXA-48
20. K.P.	R	R	R	R	KPC
21. K.P.	R	R	R	R	KPC
22. K.P.	R	R	R	R	NDM
23. K.P.	20	20	R	R	OXA-48
24. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
25. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM+OXA-48+OXA 23-58

26. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48+OXA 23-58
27. K.P.	23	30	23	23	KPC+OXA-48
28. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA-48
29. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA 23-58
30. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
31. K.P.	20	27	21	24	OXA-48
32. K.P.	R	R	R	R	OXA-48
33. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
34. K.P.	R	R	R	R	KPC
35. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM
36. K.P.	R	19	R	R	OXA-48
37. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA 23-58
38. K.P.	R	R	R	R	NDM+KPC+OXA-48+OXA 23-58
39. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
40. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
41. K.P.	R	R	R	R	KPC
42. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA 23-58
43. K.P.	R	R	R	R	KPC+NDM+OXA-48
44. K.P.	18	26	15	20	OXA-51+OXA 23-58
45. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
46. K.P.	R	R	R	R	KPC
47. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA-48+OXA 23-58
48. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA-48+OXA 23-58
49. K.P.	R	R	R	R	NDM+OXA-48
50. K.P.	R	R	R	R	KPC+OXA-48

İki merkezli çalışmamızın Real Time PCR yöntemiyle bulunan sonuçları Tablo 4.7. ve Tablo 4.8. de gösterilmiştir

Tablo 4.7. Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen numunelerin karbapenemaz direnç profilleri

Direnç Türü	Sayı(n)	Oran(%)
OXA-48	32	64
KPC+OXA-48	10	20
KPC	2	4
KPC+NDM+OXA-48	2	4
OXA-51	1	2
NDM+OXA-48	1	2
NDM+KPC	1	2
KPC+NDM+OXA-48+OXA-23+OXA-58	1	2
TOPLAM	50	100

Tablo 4.8. Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen numunelerin karbapenemaz direnç profilleri

Direnç türü	Sayı(n)	Oran(%)
NDM+OXA-48	14	28
OXA-48	9	18
KPC	5	10
KPC+OXA23-58	4	8
KPC+OXA-48	3	6
KPC+NDM+OXA-48	3	6
KPC+OXA-48+OXA23-58	2	6
NDM+OXA-48+OXA23-58	3	4
KPC+NDM+OXA-48+OXA23-58	2	4
NDM	1	2

NDM+KPC	1	2
OXA-48+OXA23-58	1	2
KPC+OXA-51+OXA23-58	1	2
OXA-51+OXA23-58	1	2
TOPLAM	50	100

Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Moleküler Yöntem (PCR) değerlendirme sonuçları tablo 4.9. da gösterilmiştir.

Tablo 4.9. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Karbapenem İnaktivasyon Metodu	45	5	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

- OXA-48 (3 adet),
- KPC+OXA-48(1 adet)
- OXA-51(1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve PCR sonuçları tablo 4.10 da gösterilmiştir.

Tablo 4.10. Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Moleküler Yöntem (PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Karbapenem İnaktivasyon Metodu	41	9	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

- OXA-48 (5 adet),
- KPC+OXA-51+OXA 23-58 (1 adet),
- KPC+OXA-48 (1)
- OXA-51+OXA 23-58 (1)
- OXA-48+OXA 23-58 (1) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

Her iki merkezde yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullandığımız fenotipik yöntem olan CIM metodunun duyarlılık ve özgüllük tablosu Tablo 4.11. de gösterilmiştir.

Tablo 4.11. Karbapenemaz varlığını tespit etmek için çalışılan CIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

	K.E.A.H	B.A.Ş.H
Duyarlılık (%)	90	82
Özgüllük (%)	100	100

Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Moleküler Yöntem (PCR) değerlendirme sonuçları tablo 4.12. da gösterilmiştir

Tablo 4.12. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu	46	4	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

-OXA-48 (3 adet),

-OXA-48+KPC (1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

-Ayrıca 2 suşta 16 mm ve 17 mm inhibisyon zon çapında tekli üreme tespit etmiş olup dirençli olarak değerlendirdik

Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve PCR sonuçları tablo 4.13. de gösterilmiştir.

Tablo 4.13. Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu	45	5	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

-OXA-48(2 adet),

-OXA-48+OXA 23-58 (1 adet),

-KPC+OXA-48(1 adet),

- KPC+OXA-51+OXA 23-58 (1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.
- Ayrıca 1 suşta 16 mm inhibisyon zon çapı tespit etmiş olup pozitif olarak değerlendirdik.

Her 2 merkezde yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullandığımız fenotipik yöntem olan mCIM metodunun duyarlılık ve özgüllük tablosu Tablo 4.14. te gösterilmiştir.

Tablo 4.14. Karbapenemaz varlığını tespit etmek için çalışılan mCIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

	K.E.A.H	B.A.Ş.H
Duyarlılık(%)	92	90
Özgüllük(%)	100	100

Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve Moleküler Yöntem (PCR) değerlendirme sonuçları Tablo 4.15. te gösterilmiştir

Tablo 4.15. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntemin (PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu	47	3	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun

- OXA-48(1 adet),
- OXA-51(1 adet),
- OXA-48+ KPC (1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ve PCR sonuçları tablo 4.16. da gösterilmiştir.

Tablo 4.16. Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntemin (PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu	44	6	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

- OXA-48 (2 adet),
- KPC+OXA-51+OXA 23-58 (1 adet),
- OXA-51+OXA 23-58 (1 adet),
- OXA-48+OXA 23-58(1 adet),
- KPC+OXA-48(1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

Her iki merkezde yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullandığımız fenotipik yöntem olan mCIM metodunun duyarlılık ve özgüllük tablosu Tablo 4.17. de gösterilmiştir.

Tablo 4.17. Karbapenemaz varlığını tespit etmek için çalışılan sCIM yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

	K.E.A.H	B.A.Ş.H
Duyarlılık(%)	94	88
Özgüllük(%)	100	100

Karabük Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem (PCR) değerlendirme sonuçları tablo 4.18. de gösterilmiştir

Tablo 4.18. Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu	49	1	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda tek yanlış negatif sonucun

-OXA-48(1 adet) izolatına ait olduğunu tespit ettik.

Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında toplanan örneklerin Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu'nun değerlendirme yöntemlerine göre sonuçları tablo 4.19. de gösterilmiştir.

Tablo 4.19. Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile Moleküler Yöntem(PCR) değerlendirilmesi

Kullanılan Metod	Pozitif	Negatif	TOPLAM
Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu	45	5	50
Moleküler Yöntem(PCR)	50	0	50

Yaptığımız çalışmada kullanılan 50 adet suşun Basitleştirilmiş Karbapenem İnaktivasyon Metodu ile altın standart olarak kabul edilen PCR sonuçlarını karşılaştırdığımızda en fazla yanlış negatif sonucun;

- OXA-48(2 adet),
- OXA-48+OXA 23-58(1 adet),
- KPC+OXA-48(1 adet),
- OXA-51+OXA 23-58(1 adet) izolatlarına ait olduğunu tespit ettik.

Her 2 merkezde yapmış olduğumuz çalışmanın sonucunda Karbapenemaz varlığını tespit etmek için kullandığımız fenotipik yöntem olan mCIM-A metodunun duyarlılık ve özgüllük tablosu Tablo 4.20. de gösterilmiştir

Tablo 4.20. Karbapenemaz varlığını tespit etmek için çalışılan mCIM-A yönteminin duyarlılık ve özgüllük sonuçları

	K.E.A.H	B.A.Ş.H
Duyarlılık(%)	98	90
Özgüllük(%)	100	100

## BÖLÜM 5

### TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç, insanların yaşları veya coğrafi konumları ne olursa olsun herkesi etkileyebileceğinden, küresel sağlık ve ilgili sektörler için önemli bir endişe kaynağı olarak kabul edilmiştir. Antibiyotik direnci, hastanede yatış süresinin uzaması, tıbbi harcamaların artması, halk sağlığı sisteminin aşırı yüklenmesi ve hatta ölüm oranlarının artması gibi olumsuz sonuçlara yol açmaktadır. Antibiyotik direnci sorunu giderek büyüdüğünden aktif müdahaleler yapılmazsa çok yakında enfeksiyonları kontrol altına alacak tedavi seçeneklerimiz tükenecektir. Acil ihtiyaç duyduğumuz yeni antibiyotiklerin zamanında geliştirilemeyeceği acı gerçeğinin farkına varan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) antibiyotiğe dirençli patojenlerin bir listesini yayınladı. Bu liste, üç kategoride sıralanan 12 bakteri grubunu içermektedir; bunlar kritik, yüksek ve orta öncelikli kategorileridir. Kritik grup, hastaların uygun bakımı için venöz/arteriyel kateter veya ventilatör gerektiren sağlık kurumlarında tehdit oluşturan bakterileri içerir ve bu durum onları kan dolaşımı enfeksiyonlarına veya hayati tehlike oluşturan pnömonilere son derece duyarlı hale getirir. Ayrıca, yüksek ve orta öncelikli kategorilere dahil edilen bakteriler, yaygın enfeksiyonlara neden olan diğer bulaşıcı etkenlerdir. Kritik öncelikli olarak belirlenen patojenlerden biri olan Enterobacteriaceae ailesi içerisinde yer alan *Klebsiella pneumonia*'dir [71]. DSÖ yayımladığı raporda; 'Dünyanın acilen antibiyotik yazma ve kullanma şeklini değiştirmesi gerekiyor. Davranış değişikliği olmadan yeni ilaçlar geliştirilse bile antibiyotik direnci büyük bir tehdit olarak kalmaya devam edecektir' şeklinde belirtmektedir. Antimikrobiyal direncin 2019 yılında 1,27 milyon ölümden doğrudan sorumlu olduğu ve 4,95 milyon ölüme katkıda bulunduğu tahmin edilmektedir. Ölüm ve sakatlığın yanı sıra antimikrobiyal direncin ciddi ekonomik maliyetleri de vardır. Dünya Bankası açıklamış olduğu raporda antimikrobiyal direncin sağlık hizmeti maliyetleri üzerindeki etkisinin 2050 yılına kadar yılda 300 milyar dolardan 1 trilyon doların üzerine çıkabileceğini öngörmektedir [72]. Ülkemizde ise, toplumda uygun

antibiyotik reçetesine öncelik veren Akılcı İlaç Kullanımı Ulusal Eylem Planı 2014-2017 adlı bir antibiyotik yönetim programı geliştirilmiştir. Uygunsuz antibiyotik kullanımını caydırıcı kamu kampanyaları da başlatılmıştır. Türkiye'de antibiyotik direnci ve tüketimi yüksek düzeyde olmakla birlikte 2015 yılında reçetesiz antibiyotik satışının yasaklanmasıyla genel tüketimde düşüş eğilimi görülmüştür. Antimikrobiyal dirence karşı başlatılan bu kampanyalara rağmen Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü, 2015 yılında üye ülkeleri arasında Türkiye'nin, görülen en düşük oranlardan yedi kat daha yüksek bir oranla en yüksek antibiyotik direnci oranlarından birine sahip olduğunu bildirmiştir. Bu raporu doğrular nitelikte Dünya Sağlık Örgütü 2015 yılında yayımladığı raporda, Türkiye'de antibiyotik tüketimi 1000 kişi başına 38,2 dir. Bu, 45 ülkeyi kapsayan DSÖ Avrupa bölgesinde bildirilen en yüksek antibiyotik tüketim oranıydı. Sürveyans açısından Türkiye, DSÖ/Avrupa'nın ortak girişimi olan Central Asian and European Surveillance of Antimicrobial Resistance(CAESAR) ağının bir üyesidir [73].

CAESAR tarafından yayımlanan 2021-2023 Avrupa antimikrobiyal direnç sürveyansı raporunda *K.pneumoniae* için karbapenem direnci (imipenem/meropenem) %49.1'dir [74]. *Klebsiella pneumoniae*, dünya çapında hastane kaynaklı ve sağlık hizmetleriyle ilişkili idrar yolu, dolaşım sistemi, solunum sistemi ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olan en önemli fırsatçı patojenlerden biri olarak kabul edilmiştir [75]. Bu sebeple çalışmamıza 100 adet *K.pneumoniae* izolatu dahil edilmiştir

Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* kolonizasyonu ve enfeksiyonu için risk faktörlerini belirlemek tedavi seçimi için önemlidir. Bu risk faktörleri; daha önceden uygulanan antibiyotik tedavisi, cerrahi işlemler, yaş, fonksiyonel bozukluklar ve yoğun bakım ünitesine yatırıştır [76]. Yaptığımız çalışmada Karabük EAH'de örneklerin geldiği bölümler arasında ilk sırada Yoğun Bakım Ünitesi (%86), Balıkesir Atatürk ŞH'de de örneklerin geldiği bölümler arasında ilk sırada Yoğun Bakım Ünitesi (%52) yer almaktadır. Çelik ve ark. yaptıkları çalışmada yoğun bakım ünitelerinde en sık görülen hastane enfeksiyonları sıralamasında pnömoni veya kan enfeksiyonları yer almıştır [77]. Yaptığımız iki merkezli çalışmada örnekleri çoğunluğunu trakeal aspirat (%28) ve kan kültürü (%24) oluşturmaktadır.

*K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 ilk olarak Türkiye'de Eylül 2001'de, İstanbul Çapa Hastanesi'nde idrar yolu enfeksiyonu ve cilt yanıkları olan 54 yaşındaki bir erkek

hastanın idrar yolundan izole edilerek tespit edilmiştir [78]. Türkiye'deki karbapenemaz türlerinin dağılımını araştıran çalışmaları incelediğimizde OXA-48 pozitifliğinin yüksek ve endemik olduğu görülmektedir. Carrër ve ark. Mayıs 2006'dan Şubat 2007 'ye kadar İstanbul Üniversitesi Hastanesi'ndeki yaptıkları çalışmada OXA-48 pozitif karbapenem dirençli *K.pneumoniae* nozokomiyal salgınını raporlamışlardır [79]. Azap ve ark. yaptıkları çalışmada izolatlarının hepsinde OXA-48 geni tespit etmişlerdir [80]. Zarakolu ve ark yaptıkları çalışmada %96.7 oranında OXA-48 geni tespit etmişlerdir [81]. Tekintaş ve ark. 54 adet karbapenem dirençli *K.pneumoniae* suşunu çalışmalarına dahil etmişlerdir. 33 suşta (%61) OXA-48 pozitifliğini tespit etmişlerdir [82]. Yaptığımız çok merkezli çalışmamızda da karbapenemaz direnç geni bakılan izolatlarda ilk sırada (%41) OXA-48 genini tespit ettik.

Karbapenemazlar antibakteriyel ilaçlara karşı direnç oluşturmaları ve başka direnç genlerini de taşımalarından dolayı çoklu ilaç direncine sebep olabilmektedir. Literatür taraması yaptığımızda OXA-48 ve NDM birlikteliği dikkat çekicidir. Pirs ve ark. Slovenya'da yapmış oldukları çalışmada %47.3 oranında NDM ve OXA-48 birlikteliğini tespit etmişlerdir [83]. Ülkemizdeki çalışmalara baktığımızda Duman ve ark. karbapenem dirençli *K.pneumoniae*' dan kaynaklanlandığını düşündükleri yoğun bakım ünitesindeki salgın raporunda OXA-48 ve NDM birlikteliğini %43 oranında tespit etmişlerdir [84]. Güdücüoğlu ve ark. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi yoğun bakım ünitesinde salgından şüphelenerek yapmış oldukları çalışmalarında OXA-48 ve NDM birlikteliğini %77.7 oranında tespit etmişlerdir [85]. Solgi ve ark. OXA-48 ve NDM birlikteliğinin yayılımını plazmidler aracılığıyla yatay gen transferi yoluyla yayılma potansiyelinin fazla olduğunu sürekli hastanelere giriş çıkış yapılarak ve seyahat sıklığının fazla olması gibi etkenlerin sayesinde toplumda yaygınlaşabileceğini ifade etmişlerdir [86].

Yaptığımız çok merkezli çalışmada dikkatimizi çeken noktalardan biri NDM ve OXA-48 birlikteliği oranının Balıkesir Atatürk ŞH'nde ilk sırada olmasıdır. Balıkesir Atatürk ŞH'nde çalışmış olduğumuz izolatların gen dağılımında OXA-48 ve NDM birlikteliği ilk sırada (%28) olmasına karşın Karabük EAH ise bu oran %2'dir. Bu farklılık bize Balıkesir'in lokasyonu gereği seyahat edilebilirliğin kolay olması, kalabalık bir nüfusa sahip olması sebebi ile hastaneye giriş çıkışların daha fazla kullanılması gibi etkenlerin etkili olduğunu düşündürmüştür.

EUCAST duyarlılık testlerinde karbapenem duyarlılığı azaldığında karbapenemaz tespiti için fenotipik testleri önermektedir [5]. Bu amaçla çalışmamızda fenotipik yöntemlerden CIM, sCIM, mCIM ve mCIM-A yöntemlerini çalışıldı. Ayrıca karbapenemaz gen varlığını saptayabilmek için altın standart olarak kabul edilen PCR yöntemi çalışılarak sonuçlar karşılaştırıldı

Karbapenem inaktivasyon metodu; karbapenemaz aktivitesini, karbapenem diskinin oluşturduğu inhibisyon zon çapı değerlendirilerek belirlenen fenotipik bir testtir. Zwaluw ve ark. tarafından geliştirilen bu yöntemde, yapmış oldukları çalışmada PCR metoduyla pozitif bulunan izolatlarda duyarlılığı %100 olarak tespit etmişlerdir. Ayrıca 67 adet non fermenter gram negatif bakterilerin karbapenemaz genini PCR ile saptayıp CIM testi uyguladıklarında ise 65 adet izolatta pozitif sonuç almışlardır ve duyarlılık oranını %97 olarak saptamışlardır. Saptayamadıkları iki suşun da *Acinetobacter baumannii*'ye ait OXA-23 geni taşımakta olduğunu bildirmişlerdir [6]. Aguirre-Quiñonero ve ark. yaptığı çalışmada 124 adet Enterobacteriaceae suşunda karbapenemaz geni pozitif bulunan 77 izolata CIM testi uygulamışlardır. 77 izolatin 66 tanesinde CIM pozitif sonuç alarak testin duyarlılığını %85.7 özgüllüğünü ise %95.7 olarak tespit etmişlerdir. Saptayamadıkları 11 suşun Enterobacter cloacae ait GES-6 genine sahip olduğunu bildirmişlerdir [87]. Demiray ve ark. çalışmasında karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında CIM testinin duyarlılığını %80 özgüllüğünü ise %93 olarak tespit etmişlerdir [88]. Alkoç yaptığı çalışmada CIM testinin duyarlılığını %72 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit etmiştir [89]. Yıldız ve ark. yaptıkları çalışmada 83 karbapenemaz üreten izolatin 81'inde CIM pozitifliği saptamıştır. CIM testinin duyarlılığı %97.59, özgüllüğü ise %100 olarak tespit edilmiştir. CIM pozitifliği tespit edilemeyen 2 izolatin ise OXA-48 genine sahip olduğunu belirlemişlerdir [90]. Sun ve ark. yaptığı çalışmada CIM yönteminin duyarlılığını %93.5, özgüllüğünü %100 tespit ederek altı farklı fenotipik yöntemin arasında en başarılı test olarak değerlendirmişlerdir [91]. Bayramoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada 56 adet karbapenem dirençli Enterobacteriaceae izolatını CIM testi ile çalışmış ve testin duyarlılığını ve özgüllüğünü %100 olarak tespit etmişlerdir [92]. Yaptığımız çalışmanın çok merkezli ve karşılaştırılabilir olması sebebiyle CIM testi sonuçlarını ayrı ayrı değerlendirdik. Karabük EAH'de PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 45 tanesinde CIM pozitifliği saptayarak, CIM testinin duyarlılığını %90 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik.

Negatif sonuç veren beş izolatin PCR sonuçlarına baktığımızda en fazla negatif sonucun OXA-48 (3) geninde olduğunu belirledik. Balıkesir Atatürk ŞH'de de aynı şekilde PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 41 tanesinde CIM pozitifliği saptayarak CIM testinin duyarlılığını %82 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren 9 izolatin PCR sonuçlarına baktığımızda en fazla negatif sonucun OXA-48 (5) genine sahip olduğunu belirledik.

Modifiye karbapenem İnaktivasyon Metodunun, CIM yönteminden farkı bakteri süspansiyonu olarak Triptik Soy Buyyon kullanılması ve inkübasyon sürelerinin uzatılarak değerlendirilmeye alınmasıdır. CLSI 2017 yılında Enterobacteriaceae ailesi için, 2018 yılında ise *P. aeruginosa* için mCIM testinin kullanımını önermiştir [7]. Pierce ve ark. nin yaptıkları çalışmada daha önce karbapenemaz genleri taşıdığı tespit edilen 92 izolatin 91' i mCIM pozitif sonuç verirken, karbapenemaz genleri taşımadığı belirlenen 23 izolatin tamamı mCIM ile negatif sonuç vermiştir. Çalışmalarında mCIM'in duyarlılığını %99, özgüllüğünü ise %100 olarak tespit etmişlerdir. Aynı çalışmayı çok merkezli (dokuz laboratuvar) olarak yürüttüklerinde mCIM testinin ortalama duyarlılığını %97 özgüllüğünü ise %99 olarak tespit etmişlerdir [93]. Kuchibiro ve ark. yaptığı çalışmada 107 karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatlarını mCIM yöntemiyle değerlendirdiklerinde duyarlılık ve özgüllüğü %100 bulmuşlardır. 100 karbapenemaz üretmeyen Enterobacteriaceae izolatlarını da mCIM ile değerlendirdiklerinde testin hem duyarlılığını hem de özgüllüğünü yine %100 olarak tespit etmişlerdir [94]. Tsai ve ark. yaptığı çalışmada mCIM testinin duyarlılığı ve özgüllüğünü %100 olarak tespit ettiklerini belirtmişlerdir [95]. Günaydın yaptığı çalışmada 100 adet karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae izolatinı mCIM testiyle değerlendirdiğinde duyarlılığı %83.8 özgüllüğü %100 olarak tespit etmiştir. Sayıca en fazla negatif sonucun OXA-48 ve NDM+OXA-48 birlikteliğine ait genler olduğunu belirtmiştir [96]. Gelmez ve ark. yaptığı çalışmada 133 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatinın mCIM pozitifliğini 109 suşta tespit ederek testin duyarlılığını %81.95, özgüllüğünü ise %100 olarak bildirmişlerdir. mCIM negatifliği tespit edilen 24 suştaki direnç genlerinin OXA-48 ve NDM genlerine ait olduğunu tespit etmişlerdir [97]. Yapmış olduğumuz çalışmanın çok merkezli ve karşılaştırılabilir olması sebebiyle mCIM testi sonuçlarını ayrı ayrı değerlendirdik. Karabük EAH'de PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 46

tanesinde mCIM pozitifliği saptayarak, mCIM testinin duyarlılığını %92 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren 4 izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda üç negatif sonucun OXA-48 genine ait olduğunu belirledik. Balıkesir Atatürk ŞH'de de aynı şekilde PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 45 tanesinde mCIM pozitifliği saptayarak mCIM testinin duyarlılığını %90 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren 5 izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda iki negatif sonucun OXA-48 genine sahip olduğunu belirledik.

Basitleştirilmiş karbapenem İnaktivasyon (sCIM) metodu ise mCIM testini temel olarak uyarlanıp modifiye edilmiş fenotipik testtir. Çalışma prensibinde; antibiyotik diskini mCIM'de olduğu gibi inkübe etmek yerine test edilecek bakteri antibiyotik diskine sürülür. 0.5 McFarland yoğunlukta hazırlanan *E.coli* ATCC 25922 standart suş ile pasajlanan Müller Hilton Agar besiyerine yerleştirilir. Hazırlanan besiyeri 16-18 saat 35°C'de inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrası zon çapları değerlendirilir. sCIM'de mCIM'den farklı olarak meropenem diski yerine imipenem diski kullanmalarının sebebi karbapenemaz enzimi ile daha hızlı hidrolize olduğu içindir. Jing ve ark. yapmış oldukları çalışmada 196 Enterobacteriaceae, 73 *A. baumannii*, 158 *P. aeruginosa* suşunu çalışmışlardır. 196 Enterobacteriaceae suşunun 147'sinin karbapenem direnç geni taşıdığını tespit edip sCIM ile çalışmışlar ve 148 izolatta pozitif bulmuşlardır. PCR ile karbapenemaz negatif bulunan fakat sCIM ile pozitif saptanan 1 izolatta tekrardan yapılan PCR sonucunda, çoğunlukla toplumda olmak üzere, hastane ortamında da en sık karşılaşılan GSBL tipi olan *K.pneumoniae* CTX-M-15 geni olduğu tespit edilmiştir. Test edilen 158 *P. aeruginosa* suşunun 25 tanesi karbapenemazı pozitif olmak üzere 149 tanesi imipenem dirençli tespit edilirken, sCIM ile PCR sonucunun uyumluluk oranını %100 olarak bildirmişlerdir. Son olarak 73 *A. baumannii* suşunun 53'ü imipenem dirençli bulunmuştur. Bu 53 suşun hepsi sCIM tarafından karbapenemaz pozitif bulunmuştur. PCR ile yapılan testlerde 52 suşun blaOXA-23 genini taşıdığı, 1 suşun ise blaVIM-2 genini taşıdığı bulunmuştur. 20 imipenem-duyarlı *A. baumannii* suşu hem sCIM hem de PCR ile negatif bulunmuştur. *A. baumannii* için sCIM ve PCR'nin uyumluluk oranı %100 olarak tespit edilmiştir [70]. Yamada ve ark. yaptıkları çalışmada sCIM testinde kullanılan antibiyotik olan imipenem ile meropenemi karşılaştırmış hem de bakteri yüklerinin (1+ bakteriyel yük= bakteriye bir kere sürülmesi, 2+ bakteriyel yük=

bakteriye 4 kere sürülmesi) sonuçlar üzerine etkisini araştırmışlardır. İmipenem diskleri 1+ bakteriyel yük ile kullanıldığında, sCIM'in duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %97 ve %100'dür. İmipenem disklerindeki bakteriyel yük 2+ olduğunda, sCIM'in özgüllüğü %57,3 duyarlılığı ise 98.5 olmuştur. Meropenem diskleri 1+ bakteriyel yük ile kullanıldığında, sCIM'in duyarlılık ve özgüllüğü sırasıyla %78.2 ve %100'dür. İmipenem disklerindeki bakteriyel yük 2+ olduğunda, sCIM'in özgüllüğü %93.9 duyarlılığı ise zon çaplarındaki belirsiz sonuçlar dahil edildiğinde %96.2 olmuştur. Yaptıkları değerlendirmede imipenem disklerinin sCIM için meropenem disklerinden daha uygun olduğunu ve yüksek duyarlılık ile özgüllük elde etmek için bakteri yükünün iyi ayarlanması gerektiğini belirtmişlerdir [98]. Wan ve ark. yaptıkları çalışmada Enterobacteriaceae izolatlarını sCIM yöntemini kullanarak imipenem ve meropenemin etkinliklerini araştırıp aralarındaki uyumu %99.1 bulmuşlardır. Meropenem diski 17 *P. aeruginosa* izolatının 10 pozitif suşu ve 36 *A. baumannii* izolatının 20 pozitif suşunu tanımlayamamıştır. Yaptıkları değerlendirmede ise sCIM yöntemi karbapenemaz üreten gram-negatif basil tespit etmek için kullanıldığında, hem imipenem hem de meropenem diskleri Enterobacteriaceae için kullanılabilirken, sadece imipenem disklerinin *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* için kullanılabileceğini tespit etmişlerdir [99]. Yapmış olduğumuz çalışmanın çok merkezli ve karşılaştırılabilir olması sebebiyle sCIM testi sonuçlarını ayrı ayrı değerlendirdik. Karabük EAH'de PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 47 tanesinde sCIM pozitifliği saptayarak sCIM testinin duyarlılığını %94 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren 3 izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda OXA-48(1), OXA-51(1) ve OXA-48+KPC genlerine ait olduğunu belirledik. Balıkesir Atatürk ŞH'de de aynı şekilde PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 44 tanesinde sCIM pozitifliği saptayarak sCIM testinin duyarlılığını %88 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren 6 izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda en fazla negatif sonucun OXA-48(2) ve OXA kombinasyonlarına ait genler olduğunu belirledik.

Amonyum bikarbonat ilaveli modifiye karbapenem inaktivasyon metodu tıpkı sCIM testinde olduğu gibi mCIM testini temel alarak uyarlanan modifiye fenotipik bir testtir. Çalışma prensibine baktığımızda uygulama basamakları hemen hemen aynıdır. Farklı olan tek uygulama basamağı Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyeri içeren tüpün içerisine

pH'sı 7.0 olarak ayarlanmış amonyum bikarbonat (son konsantrasyonu 50 mM) ilave edilmesidir. Gelmez ve ark. yaptığı çalışmada 133 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatında mCIM duyarlılığını %81.95 olarak tespit etmişlerdir. Yapmış oldukları mCIM testine amonyum bikarbonat ilave ederek değerlendirmeye almışlardır. Sonuçları analiz ederken hem CLSI M100 S28'de önerilen meropenem zon çapı sınır eşiği 19mm, hem de EUCAST meropenem duyarlılık sınır eşiği 22 mm göre değerlendirmişlerdir. 133 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatını mCIM-A<19 mm sınır eşiği değeriyle değerlendirdiklerinde mCIM-A pozitifliğini 109 suшта tespit etmişlerdir. mCIM-A'nın tespit edemediği 14 suşun 11'i OXA-48, 3'ü NDM geni taşımaktadır. mCIM-A<19 olduğunda duyarlılığı %89.47 özgüllüğü %100 olarak tespit etmişlerdir. mCIM-A<22 mm sınır eşiği değeriyle değerlendirildiğinde ise mCIM-A pozitifliğini 127 suшта tespit etmişlerdir. mCIM-A'nın tespit edemediği 6 suşun 5'i OXA-48, 1'i NDM geni taşımaktadır. mCIM-A<22 duyarlılığı %95.49 özgüllüğü %100 olarak tespit etmişlerdir [97]. Günaydın yaptığı çalışmada Gelmez ve ark. gibi mCIM-A için 2 farklı değerlendirme kriterini de çalışmıştır. 95 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatını mCIM-A<19 mm sınır eşiği değeriyle değerlendirildiğinde mCIM-A pozitifliğini 77 suшта tespit etmiştir. mCIM-A'nın tespit edemediği 18 suş ise en fazla OXA-48 ve NDM+OXA-48 genlerini taşımaktadır. mCIM-A<19 olduğunda duyarlılığı %82.7 özgüllüğü %100 olarak tespit etmiştir. mCIM-A<22 mm sınır eşiği değeriyle değerlendirildiğinde ise mCIM-A pozitifliğini 91 suшта tespit etmiştir. mCIM-A<22 olduğunda duyarlılığı %94.6 olarak tespit etmiştir. Ancak sınır eşik değeri arttırıldığı için karbapenemaz bulundurmayan 7 suştan 3 ü yanlış pozitif sonuçlanmıştır. Bu nedenle mCIM-A<22 değerlendirme kriterine göre testin özgüllüğü %100'den %57'ye düşmüştür [96]. Yapmış olduğumuz çalışmada CLSI M100 S28 önerileri doğrultusunda çalıştık. Çalışmanın çok merkezli ve karşılaştırılabilir olması sebebiyle mCIM-A testi sonuçlarını ayrı ayrı değerlendirdik. Karabük EAH'de PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 49 tanesinde mCIM-A pozitifliği saptayarak mCIM-A testinin duyarlılığını %98 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit ettik. Negatif sonuç veren tek izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda OXA-48(1) genine ait olduğunu belirledik. Balıkesir Atatürk ŞH'de de aynı şekilde PCR yöntemiyle tespit ettiğimiz karbapenem dirençli 50 *K.pneumoniae* suşunun 45 tanesinde mCIM-A pozitifliği saptayarak mCIM-A testinin duyarlılığını %90 özgüllüğünü ise %100 olarak tespit

ettik. Negatif sonuç veren 5 izolatın PCR sonuçlarına baktığımızda en fazla negatif sonucun OXA-48 (2) ve OXA kombinasyonlarına ait genler olduğunu belirledik



## BÖLÜM 6

### SONUÇLAR

Özellikle karbapenem dirençli bakterilerin sağlık tesislerinde ve toplumda hızlı yayılması, halk sağlığını tehdit etmekte, tedaviyi zorlaştırmakta ve alternatifleri kısıtlamaktadır. Bu hızlı yayılımın tespit edilip, kontrol altına alınması önemlidir. Kontrol altına alabilmek için bu izolatların hızlı ve doğru bir şekilde tespit edilmesinin yaygınlaşması gerekmektedir. Altın standart olarak kabul edilen moleküler yöntemler; zahmetli, maliyetli olduğundan ve deneyimli personel gerektirdiğinden laboratuvarda uygulanması güçtür ve yaygın kullanımı zordur. Bu sınırlamalar rutin laboratuvarda uygulanabilecek, kolay, maliyeti uygun, erişilebilir fenotipik yöntemleri gündeme getirmektedir. Çalışmamızda kullanımı daha kolay ve daha yaygın olabileceğini düşündüğümüz fenotipik testlerin performanslarını karşılaştırdık. Yapmış olduğumuz çok merkezli çalışmamızda CIM, mCIM, sCIM ve mCIM-A yöntemlerini karşılaştırdığımızda iki merkezin ortalama duyarlılıklarını sırasıyla %86, %91,%91 ve %94 özgüllüklerini ise hepsinde %100 olarak tespit ettik. Moleküler yöntemle tespit ettiğimiz fakat Karbapenem inaktivasyon metodu ve modifikasyonlarıyla negatif sonuç aldığımız izolatların direnç genlerini incelediğimizde en fazla yanlış negatif sonuç veren genlerin OXA-48 ve OXA-48'in kombinasyonları olduğunu gördük. Ülkemizin OXA-48 açısından endemik bir bölge olmasından dolayı karbapenemaz tespiti için ilk tercihin moleküler yöntemler olması gerektiğinin farkındayız. Ancak moleküler yöntemlerdeki kısıtlamaları göz önüne aldığımızda Karbapenem inaktivasyon metodu ve kombinasyonlarının yüksek duyarlılık ve özgüllükleri neticesinde rutin laboratuvar uygulamalarında kullanılabileceğini düşünüyoruz.

## KAYNAKLAR

1. Caméléna, F., Cointe, A., Mathy, V., Hobson, C., Doit, C., Bercot, B., ... & Birgy, A. (2018). Within-a-day detection and rapid characterization of carbapenemase by use of a new carbapenem inactivation method-based test, CIMplus. **Journal of clinical microbiology**, 56(9), 10-1128.
2. Patel, G., Huprikar, S., Factor, S. H., Jenkins, S. G., & Calfee, D. P. (2008). Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, 29(12), 1099-1106.
3. European Centre for Disease Prevention and World Health Organization, Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2022-2020 Data.
4. Pitout, J. D., Nordmann, P., & Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 59(10), 5873-5884.
5. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.01. July 2017
6. van der Zwaluw, K., de Haan, A., Pluister, G. N., Bootsma, H. J., de Neeling, A. J., & Schouls, L. M. (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(3), e0123690.
7. <https://clsi.org/about/press-releases/clsi-publishes-m100-performance-standards-for-antimicrobial-susceptibility-testing-31st-edition/>
8. Ashurst JV, Dawson A. *Klebsiella Pneumonia*. 2023 Jul 20. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): **StatPearls Publishing**; 2023 Jan-. PMID: 30085546.
9. Podschun, R. & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, 11(4), 589-603.
10. Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hottton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., ... & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. Database, 2020, baaa062.
11. Kumar, S. (2015). **Essentials of microbiology**. JP Medical Ltd.

12. Murray, P. R. Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. (2015). Medical microbiology. **Elsevier Health Sciences**.
13. Herridge, W. P. Shibu, P. O'Shea, J. Brook, T. C. & Hoyles, L. (2020). Bacteriophages of *Klebsiella* spp. their diversity and potential therapeutic uses. **Journal of medical microbiology**, 69(2), 176.
14. Huynh, B. T., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T., Kerleguer, A., Hennart, M., ... & Brisse, S. (2020). *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. **Gut microbes**, 11(5), 1287-1299.
15. Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., & Carattoli, A. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS microbiology reviews**, 41(3), 252-275.
16. Organization WH. Central Asian and European surveillance of antimicrobial resistance: annual report 2020. World Health Organization. **Regional Office for Europe**, 2020.
17. 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**.
18. Connie, R., MAHON, L., & Donald, C. (2018). Textbook of diagnostic microbiology. **Elsevier**.
19. Lewis, K. (2017). New approaches to antimicrobial discovery. **Biochemical pharmacology**, 134, 87-98.
20. Cag, Y., Caskurlu, H., Fan, Y., Cao, B., & Vahaboglu, H. (2016). Resistance mechanisms. **Annals of translational medicine**, 4(17).
21. Mekanizmalar, A. D. (2001). Beta-Laktamlara ve Karbapenemlere Direnç.
22. Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of infectious diseases**, 215(suppl\_1), S28-S36.
23. Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, 20(3), 440-458.
24. Navon-Venezia, S., Leavitt, A., Schwaber, M. J., Rasheed, J. K., Srinivasan, A., Patel, J. B., & Carmeli, Y. (2009). First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 53(2), 818-820

25. Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *54*(3), 969-976.
26. Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L., & Nordmann, P. (2005). Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm?. **Clinical microbiology reviews**, *18*(2), 306-325.
27. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., & Mitsuhashi, S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *35*(1), 147-151.
28. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., ... & Kato, N. (1994). Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *38*(1), 71-78.
29. Lauretti, L., Riccio, M. L., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., & Rossolini, G. M. (1999). Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *43*(7), 1584-1590.
30. Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. (2009). Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *53*(12), 5046-5054
31. Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., ... & Woodford, N. (2010). Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet infectious diseases**, *10*(9), 597-602.
32. Poirel, L., Özdamar, M., Ocampo-Sosa, A. A., Türkoglu, S., Ozer, U. G., & Nordmann, P. (2012). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *56*(5), 2784.
33. Nordmann, P., Dortet, L., & Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm!. **Trends in molecular medicine**, *18*(5), 263-272.
34. Paton, R., Miles, R. S., Hood, J., & Amyes, S. G. B. (1993). ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **International journal of antimicrobial agents**, *2*(2), 81-87.
35. Evans, B. A., & Amyes, S. G. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, *27*(2), 241-263.

36. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48(1), 15-22.
37. Toraman, Z. A., & Yakupogullari, Y. (2003). Carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and ciprofloxacin use in neonatal intensive care units. **Journal of Hospital Infection**, 54(2), 164-165.
38. TORAMAN, Z. A., YAKUPOĞULLARI, Y., & KİZİRGİL, A. (2005). Investigation of metallo beta-lactamases in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains. **Infek. Derg**, 19, 101-105.
39. Bahar, G., Mazzariol, A., Koncan, R., Mert, A., Fontana, R., Rossolini, G. M., & Cornaglia, G. (2004). Detection of VIM-5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54(1), 282-283.
40. Aktas, Z., Bal, C., Midilli, K., Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. **Clinical Microbiology and Infection**, 12(7), 695-696.
41. Demir, Y., Zer, Y., & Karaoglan, I. (2015). Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, 28.
42. Iraz, M., Düzgün, A. Ö., Sandallı, C., Doymaz, M. Z., Akkoyunlu, Y., Saral, A., ... & Çiçek, A. Ç. (2015). Distribution of  $\beta$ -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. **Annals of laboratory medicine**, 35(6), 595.
43. Heydari, F., Mammina, C., & Koksall, F. (2015). NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST85 now in Turkey, including one isolate from a Syrian refugee. **Journal of Medical Microbiology**, 64(9), 1027-1029.
44. Kilic, A., & Baysallar, M. (2015). The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. **Annals of laboratory medicine**, 35(3), 382.
45. Labarca, J., Poirel, L., Özdamar, M., Turkoglu, S., Hakko, E., & Nordmann, P. (2014). KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. **New microbes and new infections**, 2(2), 50-51.
46. Bogaerts, P., Naas, T., El Garch, F., Cuzon, G., Deplano, A., Delaire, T., ... &

- Glupczynski, Y. (2010). GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *54*(11), 4872-4878.
47. Cicek, A. C., Saral, A., Iraz, M., Ceylan, A., Duzgun, A. O., Peleg, A. Y., & Sandalli, C. E. M. A. L. (2014). OXA-and GES-type  $\beta$ -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, *20*(5), 410-415.
  48. Girlich, D., Poirel, L., & Nordmann, P. (2012). Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, *50*(2), 477-479.
  49. CLSI. (2018). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 28 th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute
  50. KILIÇ, Ü., DEMİRAY, T., & ALTINDİŞ, M. (2016). KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARININ SAPTANMASINDA FENOTİPİK VE GENOTİPİK METOTLAR. **Ankem Derg**, *30*(2), 62-75.
  51. Nordmann, P., Poirel, L., & Dortet, L. (2012). Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, *18*(9), 1503.
  52. Tijet, N., Boyd, D., Patel, S. N., Mulvey, M. R., & Melano, R. G. (2013). Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, *57*(9), 4578-4580.
  53. Mitra, S., Kazi, M., Panchal, M., Rodrigues, C., & Shetty, A. (2015). Evaluation of Carba NP test for rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Indian journal of medical microbiology**, *33*(4).
  54. Pasteran, F., Denorme, L., Ote, I., Gomez, S., De Belder, D., Glupczynski, Y., ... & Corso, A. (2016). Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. **Journal of clinical microbiology**, *54*(11), 2832-2836.
  55. Glupczynski, Y., Evrard, S., Ote, I., Mertens, P., Huang, T. D., Leclipteux, T., & Bogaerts, P. (2016). Evaluation of two new commercial immunochromatographic assays for the rapid detection of OXA-48 and KPC carbapenemases from cultured bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, *71*(5), 1217-1222.
  56. Notake, S., Matsuda, M., Tamai, K., Yanagisawa, H., Hiramatsu, K., & Kikuchi, K. (2013). Detection of IMP metallo- $\beta$ -lactamase in carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae and non-glucose-fermenting Gram-negative rods by

- immunoassay. **Journal of clinical microbiology**, 51(6), 1762-1768.
57. Vrioni, G., Daniil, I., Voulgari, E., Ranellou, K., Koumaki, V., Ghirardi, S., ... & Tsakris, A. (2012). Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. **Journal of clinical microbiology**, 50(6), 1841-1846.
  58. Simner, P. J., Martin, I., Opene, B., Tamma, P. D., Carroll, K. C., & Milstone, A. M. (2016). Evaluation of multiple methods for detection of gastrointestinal colonization of carbapenem-resistant organisms from rectal swabs. **Journal of clinical microbiology**, 54(6), 1664-1667.
  59. YILMAZ, S., DUYAN, S., ARTUK, C., & DİKTAŞ, H. (2014). Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS Uygulamaları. **TSK Koruyucu Hekimlik Bülteni**, 13(5), 421-426.
  60. 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. **Journal of clinical microbiology**, 49(9), 3222-3227.
  61. Papagiannitsis, C. C., Študentová, V., Izdebski, R., Oikonomou, O., Pfeifer, Y., Petinaki, E., & Hrabák, J. (2015). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry meropenem hydrolysis assay with NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>, a reliable tool for direct detection of carbapenemase activity. **Journal of clinical microbiology**, 53(5), 1731-1735.
  62. Ghebremedhin, B., Halstenbach, A., Smiljanic, M., Kaase, M., & Ahmad-Nejad, P. (2016). MALDI-TOF MS based carbapenemase detection from culture isolates and from positive blood culture vials. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 15(1), 1-6.
  63. Lasserre, C., De Saint Martin, L., Cuzon, G., Bogaerts, P., Lamar, E., Glupczynski, Y., ... & Tandé, D. (2015). Efficient detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in less than 30 minutes. **Journal of clinical microbiology**, 53(7), 2163-2171
  64. TEKİN, K., AYGAR, İ. S., & HOŞBUL, T. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Teknolojisinin Temel Prensipleri Basic Principles of Polymerase Chain Reaction Technology.
  65. Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, 17(10), 1791.
  66. Ulyashova, M. M., Rubtsova, M. Y., Edelstein, M. V., Alexandrova, I. A., & Egorov, A. M. (2010). Oligonucleotide microarray for the identification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. **Acta Naturae (англоязычная версия)**, 2(3

(6)), 101-109.

67. Naas, T., Cuzon, G., Bogaerts, P., Glupczynski, Y., & Nordmann, P. (2011). Evaluation of a DNA microarray (Check-MDR CT102) for rapid detection of TEM, SHV, and CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and of KPC, OXA-48, VIM, IMP, and NDM-1 carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, *49*(4), 1608-1613.
68. Parizad, E. G., Parizad, E. G., & Valizadeh, A. (2016). The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, *10*(1), DE01.
69. Hammoudi, D., Moubareck, C. A., & Sarkis, D. K. (2014). How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. **Journal of microbiological methods**, *107*, 106-118.
70. Jing, X., Zhou, H., Min, X., Zhang, X., Yang, Q., Du, S., ... & Zeng, J. (2018). The simplified carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of carbapenemase-producing gram-negative bacilli. **Frontiers in microbiology**, *9*, 2391.
71. Shrivastava, S. R., Shrivastava, P. S., & Ramasamy, J. (2018). World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, *32*(1), 76-77.
72. WHO. Antimicrobial resistance – fact sheet. 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
73. Torumkuney, D., Aktas, Z., Unal, S., van Hasselt, J., Seyhun, Y., & Keles, N. (2022). Country data on AMR in Türkiye in the context of community-acquired respiratory tract infections: links between antibiotic susceptibility, local and international antibiotic prescribing guidelines, access to medicine and clinical outcome. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, *77*(Supplement\_1), i51-i60.
74. “Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2023–2021 Data”. [https://www.who.int/europe/groups/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-\(caesar\)](https://www.who.int/europe/groups/central-asian-and-european-surveillance-of-antimicrobial-resistance-(caesar))
75. Hou, X. H., Song, X. Y., Ma, X. B., Zhang, S. Y., & Zhang, J. Q. (2015). Molecular characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, *46*, 759-768.
76. Jiao, Y., Qin, Y., Liu, J., Li, Q., Dong, Y., Shang, Y., ... & Liu, R. (2015). Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization and predictors of mortality: a retrospective study. **Pathogens and global health**, *109*(2), 68-74.

77. Çelik, R., & Filiz, Ö. Z. E. L. (2020). YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDE OLUŞAN HASTANE ENFEKSİYONLARI BULUNMA ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI. *Sağlık Akademisi Kastamonu*, 5(3).
78. Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 48(1), 15-22.
79. Carrër, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Cagatay, A. A., Badur, S., & Nordmann, P. (2008). Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 52(8), 2950-2954.
80. Azap, Ö., Otlu, B., Yeşilkaya, A., & Yakupoğulları, Y. (2013). Detection of OXA-48-like carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care center in Turkey: molecular characterization and epidemiology. **Balkan medical journal**, 30(2), 259.
81. Zarakolu, P., Eser, O. K., Aladag, E., Al-Zahrani, I. A., Day, K. M., Atmaca, O., ... & Akova, M. (2016). Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 85(4), 466-470.
82. Tekintaş, Y., Çilli, F., Eraç, B., Yaşar, M., Aydemir, S. S., & Hoşgör Limoncu, M. İ. N. E. (2017). Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. **MikrobiyolBul**, 51(3), 269-76.
83. Pirš, M., Kišek, T. C., Hergouth, V. K., Seme, K., Premru, M. M., Jeverica, S., ... & Zupanc, T. L. (2019). Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia 2014–2016. **Journal of Hospital Infection**, 101(2), 142-149.
84. Duman, Y., Ersoy, Y., Gursoy, N. C., Toplu, S. A., & Otlu, B. (2020). A silent outbreak due to *Klebsiella pneumoniae* that co-produced NDM-1 and OXA-48 carbapenemases, and infection control measures. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 23(1), 46.
85. Guducuoglu, H., Gursoy, N. C., Yakupogullari, Y., Parlak, M., Karasin, G., Sunnetcioglu, M., & Otlu, B. (2018). Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1-and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*: high mortality from pandrug resistance. **Microbial Drug Resistance**, 24(7), 966-972.
86. Solgi, H., Nematzadeh, S., Giske, C. G., Badmasti, F., Westerlund, F., Lin, Y. L., ... & Shahcheraghi, F. (2020). Molecular epidemiology of OXA-48 and NDM-1 producing enterobacterales species at a University Hospital in Tehran, Iran, between 2015 and 2016. **Frontiers in microbiology**, 11, 936.
87. Aguirre-Quiñonero, A., Cano, M. E., Gamal, D., Calvo, J., & Martínez-Martínez, L. (2017). Evaluation of the carbapenem inactivation method (CIM) for detecting

carbapenemase activity in enterobacteria. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, 88(3), 214-218.

88. Demiray, T., Aydemir, Ö., Kılıç, Ü., Yılmaz, K., Köroğlu, M., & Altındış, M. (2017). Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz saptanmasında karbapenemaz inaktivasyon testinin kullanımı.
89. Alkoç, F. (2018). Hastanemizde İzole Edilen Karbapenem Dirençli Enterobacterales Suşlarında Karbapenemaz Üretiminin Fenotipik Yöntemlerle Tespiti, Uzmanlık Tezi, Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara
90. Yıldız, S. S., Kaşkatepe, B., Avcıküçük, H., & Öztürk, Ş. (2017). Performance of CarbaNP and CIM tests in OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, 64(1), 9-16.
91. Sun, K., Xu, X., Yan, J., & Zhang, L. (2017). Evaluation of six phenotypic methods for the detection of carbapenemases in Gram-negative bacteria with characterized resistance mechanisms. **Annals of Laboratory Medicine**, 37(4), 305-312.
92. BAYRAMOĞLU, G., ULUÇAM, G., & ÖZGÜR, Ç. G. (2016). Karbapenemaz Üreten Enterobacteriaceae Suşlarının Saptanmasında Karbapenem İnaktivasyon Yönteminin Değerlendirilmesi. **Mikrobiyol Bul**, 50(3), 505-507.
93. Pierce, V. M., Simner, P. J., Lonsway, D. R., Roe-Carpenter, D. E., Johnson, J. K., Brasso, W. B., ... & Das, S. (2017). Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, 55(8), 2321-2333.
94. Kuchibiro, T., Komatsu, M., Yamasaki, K., Nakamura, T., Nishio, H., Nishi, I., ... & Wada, Y. (2018). Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 24(4), 262-266.
95. Tsai, Y. M., Wang, S., Chiu, H. C., Kao, C. Y., & Wen, L. L. (2020). Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **BMCmicrobiology**, 20(1),1-7.
96. Günaydın, B. (2022). KARBAPENEMAZ ÜRETEN ENTEROBACTERIACEAE TESPİTİNDE KULLANILAN FENOTİPİK TESTLERİN ETKİNLİKLERİNİN PROSPEKTİF OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ, Uzmanlık Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı, Tekirdağ
97. Gelmez, G. A., Can, B., Hasdemir, U., & Soyletir, G. (2021). Evaluation of phenotypic tests for detection of carbapenemases: New modifications with new interpretation. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 27(2), 226-231.

98. Yamada, K., Sasaki, M., Murakami, H., Aoki, K., Morita, T., Ishii, Y., & Tateda, K. (2021). Evaluation of the simplified carbapenem inactivation method as a phenotypic detection method for carbapenemase-producing Enterobacterales. **Journal of Microbiological Methods**, *187*, 106273.
99. Wan, D., Jing, X., Zhou, H., Min, X., Zhang, X., Wu, T., ... & Zeng, J. (2020). Differences between meropenem and imipenem disk to detect carbapenemase in gram-negative bacilli using simplified carbapenem inactivation method. **Journal of Infection and Chemotherapy**, *26*(6), 636-639.



## ÖZGEÇMİŞ

Muharrem NASLI eğitimini 2013-2015 yılları arasında Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Tıbbi Laboratuvar Teknikleri bölümünden, 2015-2019 yılları arasında yine aynı üniversite çatısı altında Hemşirelik Fakültesi'ni tamamladı.2021 yılında Karabük Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda Tezli Yüksek Lisans programında eğitimine başladı. Aktif olarak Balıkesir Atatürk Şehir Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında Tıbbi Laboratuvar Teknikeri olarak çalışmaktadır.