

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEM DUYARLI OLMAYAN *Klebsiella pneumoniae*
İZOLATLARININ MLST, MALDI-TOF, PFGE İLE MOLEKÜLER
EPİDEMİYOLOJİSİNİN İNCELENMESİ

ARŞ. GÖR. DR. YUNUS EMRE İBİK

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. AYŞEGÜL ÇOPUR ÇİÇEK

TIPTA UZMANLIK TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

RİZE-2022

TEŞEKKÜR

Tıbbi Mikrobiyoloji tıpta uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmayı bilgi ve katkılarıyla yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen, uzmanlık eğitimim süresinde yetişmemde büyük katkı ve emeği geçen değerli danışman hocam Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK'e,

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Zihni Acar YAZICI'ya, Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ'e, Doç. Dr. Kazım ŞAHİN'e ve Dr. Öğr. Üyesi İlkey BAHÇECİ'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli kıdemlilerim Uzm. Dr. Sema KOÇYİĞİT KALCAN ve Uzm. Dr. Deniz Zehra ULUSAN GÜNDOĞDU'ya, sevgili asistan arkadaşlarım Dr. Nuray ARSLAN, Dr. Hamiyet Büşra GÜNDOĞDU, Dr. Mustafa ÖZCAN, Dr. Ömer Faruk DURAN, Dr. Esra KARACA, Dr. Duygu AKSOY, Dr. Soner YILDIZ, Dr. Yunus Emre ALPDOĞAN ve Dr. Sefa BALIK'a,

Özellikle tez sürecinde deneysel çalışmalarda yardımcı olan Öğr. Gör. Nebahat EJDER'e ve Erva RAKICI'ya,

Moleküler testlerin yorumlanmasında yardımcı olan Prof. Dr. Elif SEVİM ve Prof. Dr. Rıza DURMAZ'a,

Klinik laboratuvarımızda her daim uyum içinde çalıştığımız çok değerli teknisyen arkadaşlarıma ve tüm mesai arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde en büyük emeği olan, hiçbir fedakarlığı esirgemeyen, hayatımın her döneminde yanımda olan sevgili babam Murat İBİK, sevgili annem Fatma İBİK, canım kardeşlerim Halil İbrahim İBİK, Tuğba KEMBİL ve Tunahan İBİK'e

Her daim desteği ile yanımda olan, hayatımı birleştirdiğim için şükrettiğim, sonsuz anlayışı ve sevgisi için can yoldaşım, değerli eşim Sümeyye İBİK'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Bu tez çalışması, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından TTU-2020-1104 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Dr. Yunus Emre İBİK

ÖZET

Giriş ve Amaç: Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tedavi gören hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen karbapenem duyarlı olmayan *K.pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnç genleri ile virülans genleri ve suşlar arası klonal ilişkisinin epidemiyolojik verilerle birlikte moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: VITEK-2 (BioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile karbapenem grubu duyarlı olmayan 32 adet *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edildi. Kolistin dirençli 13 adet suş kolistin sıvı mikrodilüsyon test edildi. Karbapenem dirençli suşlarda sık görülen çeşitli antibiyotik direnç genleri ve virülans genleri PCR ile tarandı. Karbapenemazların hızlı tanısında kullanılan immunokromatografik testler ile PCR sonucu uyumlulukları karşılaştırıldı. Ayrıca hastanemizden izole edilen karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* suşlarının klonal ilişkisini belirlemek amacıyla PFGE, MLST ve MALDI-TOF MS yöntemleri kullanıldı.

Bulgular: Tüm suşlar için en yüksek direnç TZP, CAZ, FEP ve MEM'e karşı gösterildi. En duyarlı antibiyotik olarak ise gentamisin (%78,1) olarak bulundu. Suşların 31'inin karbapenemaz genlerinden en az birini taşıdığı PCR ile gösterildi. Bir suшта ise OXA-48+NDM birlikteliği gösterildi. Direnç genlerinden en sık SHV (%84,3) olmak üzere sırayla CTX-M-1(%46,8), OXA-48(%40,6), KPC(%40,6), TEM(%31,2), NDM(%18,8) olduğu bulundu. Virülans genlerinden en sık *magA*(%68,7) olmak üzere sırayla *kpn*(%59,3) ve K2(%9,3) tespit edildi. İmmünokromatografik testler PCR sonuçları ile %100 uyumlu bulundu. VITEK-2 otomatize sistem sonuçlarına göre kolistin dirençli bulunan tüm izolatlar kolistin sıvı mikrodilüsyon ile de dirençli bulundu. PFGE ile yapılan analizde izolatların 19'unun Tenover kriterlerine göre 6 farklı küme içinde kümelendiği gösterildi, diğer izolatlar ise birbirleriyle ilişkisiz olarak saptandı. MLST analizlerinde ST101 tipi %29 oranında en yaygın ST tipi olarak belirlendi. ST101'i sırasıyla ST16, ST307, ST14, ST147, ST309, ST377, ST395 ve ST2096 tipleri takip etmektedir. MALDI-TOF MS ile yapılan bakteriyel tanımlamada VITEK-2 ile arasındaki uyum %94,3 olarak bulundu. Moleküler tiplendirme değerlendirme sonucu suşlar arasındaki maksimum benzerlik %70'i geçmedi.

Sonuç: Ülkemizde endemik olan OXA-48'in yanı sıra, dünya genelinde daha sık görülen KPC'nin giderek yaygınlaştığı tespit edildi. İmmünokromatografik testler maliyet

etkinliği açısından değerlendirilerek laboratuvarlarda kullanılabilir. Moleküler tiplendirmede MLST ile PFGE sonuçlarının uyumlu olduğu gösterildi. Ancak MALDI-TOF MS ile uyumlu bulunmadı. Moleküler tiplendirme yöntemleri arasında PFGE en iyi yöntem olarak görülmektedir. Bakteriyel tanımlamada VITEK-2, MALDI-TOF MS ve MLST arasında farklılıklar bulunmaktadır. Karbapeneme dirençli bakterilerin enfeksiyon kontrolü açısından her kurum tarafından takip edilmesi, hem tüm dünyada global bir halk sağlığı sorunu haline gelen antibiyotik direnci ile mücadele için akılcı antibiyotik kullanım politikalarına hem de enfeksiyon kontrolnlemlerine katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: *K. pneumoniae*, karbapenem, PFGE, MLST, MALDI-TOF MS



ABSTRACT

Introduction and Purpose: This study aimed to evaluate antibiotic resistance genes and virulence genes and the clonal relationship of the carbapenem-nonsusceptible *K.pneumoniae* strains by molecular methods with epidemiological data which are isolated from various clinical specimens from patients treated at Recep Tayyip Erdogan University Training and Research Hospital.

Materials and Methods: Thirty-two carbapenem non-susceptible *K. pneumoniae* isolates were included in the study with the VITEK-2 (BioMérieux, France) automated system. Thirteen colistin-resistant strains were tested with colistin microdilution method. Various antibiotic resistance genes and virulence genes frequently seen in carbapenem-resistant strains were screened by PCR. Immunochromatographic tests used in the rapid diagnosis of carbapenemases were compared with PCR results. In addition, PFGE, MLST and MALDI-TOF MS methods were used to determine the clonal relationship of carbapenem-nonsusceptible *K. pneumoniae* strains isolated from our hospital.

Results: For all strains, the highest resistance was demonstrated against TZP, CAZ, FEP and MEM. Gentamicin (78.1%) was found to be the most sensitive antibiotic. PCR demonstrated that 31 of the strains carried at least one of the carbapenemase genes. In one strain, the coexistence of OXA-48+NDM was shown. The most common resistance genes were determined as SHV (84.3%), CTX-M-1(46.8%), OXA-48(40.6%), KPC(40.6%), TEM(31.2%), NDM(18.8%) respectively. Among the virulence genes; *magA* (68.7%) was the most common, followed by *kpn*(59.3%) and K2(9.3%). Immunochromatographic tests were found to be 100% compatible with PCR results. According to the results of VITEK-2 automated system, all isolates found to be resistant to colistin were also found to be resistant by colistin broth microdilution. In PFGE analysis, it was shown that 19 of the isolates clustered in 6 different clusters according to the Tenover criteria, while the other isolates were found to be unrelated to each other. In MLST analysis, ST101 type was determined as the most common ST type with a rate of 29%. ST101 is followed by ST16, ST307, ST14, ST147, ST309, ST377, ST395 and ST2096, respectively. The compatibility rate between MALDI-TOF MS and VITEK-2 was found 94.3%, in bacterial identification.

As a result of the molecular typing evaluation, the maximum similarity between the strains was less than 70%.

Conclusion: In addition to OXA-48, which is endemic in our country, it has been determined that KPC, which is more common in the world, is becoming increasingly common. In molecular typing, MLST and PFGE results were shown to be compatible. However, they were not compatible with MALDI-TOF MS. Among the molecular typing methods, PFGE is seen as the best method. There are differences between VITEK-2, MALDI-TOF MS and MLST in bacterial identification. Monitoring of carbapenem-resistant bacteria by each institution in terms of infection control will contribute to rational antibiotic use policies and infection control measures to combat antibiotic resistance, which has become a global public health problem all over the world.

Keywords: *K. pneumoniae*, carbapenem, PFGE, MLST, MALDI-TOF MS

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET.....	ii
ABSTRACT.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
TABLolar DİZİNİ.....	ix
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1.Tarihçe ve Taksonomi.....	3
2.2.Biyokimyasal Özellikleri.....	3
2.3.Laboratuvar Tanısı.....	3
2.4.Virülans Faktörleri.....	5
2.4.1.Kapsül.....	5
2.4.2.Lipopolisakkarid.....	5
2.4.3.Siderofor.....	6
2.4.4.Fimbriyalar.....	6
2.4.5.Allantoin metabolizması.....	6
2.4.6.Hipervirülen <i>K. pneumoniae</i> (hvKp).....	6
2.5.Klinik Seyir ve Epidemiyoloji.....	8
2.6. <i>K. pneumoniae</i> Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler.....	9
2.6.1.β-Laktamlar.....	10
2.6.1.1.Karbapenemler.....	10
2.6.2.Kolistin.....	10
2.7.Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	11
2.7.1.Karbapenem Direnci.....	11
2.7.1.1. β-laktamazlar.....	11
2.7.1.1.1.A Sınıfı Betalaktamazlar.....	12
2.7.1.1.2.B Sınıfı Betalaktamazlar.....	12
2.7.1.1.3.C Sınıfı Betalaktamazlar.....	12
2.7.1.1.4.D Sınıfı Betalaktamazlar.....	12
2.7.1.2. Efflux Pompaları ve Dış Membran Protein Değişikliği.....	13
2.7.2.Kolistin Direnci.....	13
2.8.Karbapenem Tanı Yöntemleri.....	13
2.8.1.Fenotipik Yöntemler.....	14
2.8.1.1.Modifiye Hodge Testi (MHT).....	14
2.8.1.2.Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM).....	15
2.8.1.3.Carba NP.....	15
2.8.1.4.Kombine Disk Yöntemi.....	15
2.8.1.5.Kromojenik Agar.....	16
2.8.1.6.MALDI-TOF MS.....	16
2.8.1.7.Yanal Akımlı İmmünokromatografik Test.....	18
2.8.2.Genotipik Yöntemler.....	18
2.9.Karbapenem Dirençli <i>K. pneumoniae</i> 'nın Moleküler Epidemiyolojisi.....	19
2.10.Moleküler Epidemiyolojide Kullanılan Teknikler.....	21
2.10.1.Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST).....	22

2.10.1.1.Ribozomal MLST.....	23
2.10.1.2.Kor Genom MLST (cg-MLST).....	23
2.10.1.3.Tüm Genom MLST (wgMLST).....	23
2.10.2.Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....	24
2.10.2.1.PFGE Çeşitleri.....	25
2.10.2.2.CHEF Sistemi.....	25
2.10.2.3.PFGE Analizi.....	26
2.10.3. Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon / iyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS).....	26
3.GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1.Çalışmada Kullanılan İzolatlar.....	27
3.2.Besiyerleri.....	27
3.2.1.Hazır Petri Koyun Kanlı Agar (%5) Besiyeri.....	27
3.2.2.Eozin-Metilen Blue (EMB) Agar.....	27
3.2.3.Gliserol (%20) içeren LB Besiyeri.....	27
3.2.4.Müller-Hinton Agar (MHA).....	27
3.3.Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	29
3.4.Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması.....	29
3.4.1.Suşların Canlandırılması.....	29
3.4.2.DNA İzolasyonu.....	29
3.4.3.Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması.....	30
3.4.4.Virülans genlerinin PCR ile Araştırılması.....	31
3.4.5.Amplifikasyon Koşulları.....	31
3.4.6.Elektroforez ve Görüntüleme.....	32
3.4.İmmünokromatografik Test.....	32
3.5.Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon.....	33
3.6.Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....	34
3.7.Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST).....	35
3.8.MALDI-TOF MS.....	36
4.BULGULAR.....	38
4.1.Antibiyogram Sonuçları.....	38
4.2.Direnç ve Virülans Genleri Tarama Sonuçları.....	39
4.3.İmmünokromatografik Test Sonuçları.....	40
4.4.Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon Sonuçları.....	40
4.5.PFGE Sonuçları.....	41
4.6.MLST Sonuçları.....	44
4.7.MALDI-TOF MS Sonuçları.....	45
5.TARTIŞMA.....	47
6.SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	54
7.KAYNAKÇA.....	56
8.ETİK KURUL RAPORU.....	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: EMB besiyeri mukoid koloni görünümü ve Gram boyama görüntüsü

Şekil 2: Biyokimyasal testler ve VITEK-2 otomatize tanımlama sistemi

Şekil 3: *K. pneumoniae* virülans faktörleri

Şekil 4: String Testi

Şekil 5: Karbapenem inaktivasyon metodu

Şekil 6: Carba NP metodu ve Kombine Disk Metodu

Şekil 7: MALDI-TOF VITEK MS cihazı ve çalışma prensibi

Şekil 8: RESIST-5 K-Set O.K.N.V.I

Şekil 9: EuSCAPE sistemine kayıtlı Karbapenem direnç mekanizmalarının dağılımı

Şekil 10: ICT test protokolü

Şekil 11: CHEF-DR II sistemi

Şekil 12: ICT test sonuçları

Şekil 13: Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon Sonuçları

Şekil 14: PFGE Jel Görüntüleri

Şekil 15: MALDI-TOF MS Dendrogram Analizi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: hvKP, cKp farkları

Tablo 2: Betalaktamazların moleküler sınıflandırılması (Ambler Sınıflaması)

Tablo 3: EUCAST a göre karbapenemaz üreten suşlar için sınır değerler ve tarama eşik değerleri

Tablo 4: Kullanılan çözeltiler

Tablo 5: PCR Karışımındaki reaktif miktarları

Tablo 6: Antibiyotik direnç genleri için kullanılan primer dizileri, amplikon büyüklükleri(bp) ve primer bağlanma sıcaklıkları (Tm)

Tablo 7: Virülans genleri için kullanılan primer dizileri

Tablo 8: MLST için kullanılan primer dizileri

Tablo 9: İzolatların antibiyogram sonuçları

Tablo 10: PCR ile tespit edilen direnç ve virülans genleri

Tablo 11: Kolistin direnç karşılaştırması

Tablo 12: PFGE ile aynı olarak tespit edilen izolatlar

Tablo 13: Yakın ilişkili izolatlar

Tablo 14: Muhtemel ilişkili izolatlar

Tablo 15: Birbirleriyle ve diğer suşlarla ilişkisiz izolatlar

Tablo 16: *K. pneumoniae* izolatlarının MLST analizleri sonucunda belirlenen ST tipleri

Tablo 17: İzolatların ST tipleri dağılımı

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MLST: Multilokus Sekans Tiplendirmesi

MALDI-TOF MS: Matriks aracılı lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi

PFGE: Pulsed Field Jel Elektroforezi

VP: Voges-Proskauer

TSI: Triple Sugar Iron

OMP: Dış membran proteinleri

CPS: kapsül polisakkaridi

LPS: Lipopolisakkarid

ECDC: Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi

hvkp: Hipervirulan *K. pneumoniae*

ckp: Klasik *K. pneumoniae*

TKP: Toplum kaynaklı pnömoni

HKP: Hastane kaynaklı pnömoni

VİP: Ventilator ilişkili pnömoni

KdKp: Karbapenem Dirençli *K. pneumoniae*

PBP: Penisilin Bağlayan Proteinler

MDR: Çoklu ilaca dirençli

GNB: Gram negatif bakteri

FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi

KPC: *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

GES: Guiana extended-spectrum beta-lactamase

SME: *Serratia marcescens* enzymes

VEB: Vietnam extended-spectrum beta laktamaz

OXA: Oksasilinaz

IMP: Imipenemase

VIM: Verona integron-encoded metallo- beta laktamaz

NDM: New Delhi Metallo– beta laktamaz

SPM: Sao Paulo metallo- beta laktamaz

SIM: Seoul imipenemase

GSBL: Genişletilmiş spektrumlu betalaktamaz

MBL: Metallo-betalaktamazlar

mcr: Mobilize kolistin direnci

MİK: Minimum inhibitor konsantrasyon

EUCAST: Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi

ECOFF: Epidemiyolojik eşik değeri

KÜE: Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*

ATCC: American Type Culture Collection

MHT: Modifiye Hodge Testi

MHA: Müller Hinton Agar

CIM: Karbapenem inaktivasyon metodu

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

ICT: İmmünokromatografik test

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ST: Sekans Tipi

EuSCAPE: European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*

CC: Klonal kompleks

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

RFLP: Restriction fragment length polymorphism

RAPD-PCR: Random Amplified Polymorphic DNA-PCR

ERIC-PCR: Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR

Rep-PCR: Repetitive sequence based PCR

VNTR: Variable number tandem repeat

WGS: tüm genom sekanslama

bp: baz çifti

eBURST: Based Upon Related Sequence Types

rMLST: Ribozomal MLST

cgMLST: Kor Genom MLST

NGS: Next Generation Sequencing

SNP: Tek nükleotid Polimorfizm

wgMLST: Tüm Genom MLST

RGE: Rotating Gel Electrophoresis

OFAGE: Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis

TAFE: Transverse Alternating Field Electrophoresis

CHEF: Clamped Homogeneous Electric Field

FIGE: Field Inversion Gel Electrophoresis

ST/RIDE: Simultaneously tangential/rectangular inversion decussate electrophoresis

EMB: Eozin-Metilen Blue

LB: Luria-Bertani

HST: Hücre Süspansiyon Tamponu

HLS-1: Hücre lizis solüsyonu-1

HLS-2: Hücre lizis solüsyonu-2

TBE: Tris Borik Asit Etilendiamintetraasetik asit

TAE: Tris Asetik Asit Etilendiamintetraasetik asit

Tm: Primer bağlanma sıcaklığı

SDS: Sodyum Dodesil Sülfat

TE: Tris EDTA

COVID-19: Koronavirüs Hastalığı 2019

AK: Amikasin

GN: Gentamisin

TOB: Tobramisin

CIP: Siprofloksasin

LEV: Levofloksasin

CAZ: Seftazidim

IPM: İmipenem

MEM: Meropenem

FEP: Sefepim

TZP: Piperasillin/tazobaktam

SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol

COL: Kolistin

TIG: Tigesiklin

BAP: Bilimsel Araştırma Projeleri

UV: Ultraviyole

E-test: Epsilomer test

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella pneumoniae hastaneye yatırılan ve immün bağışıklığı baskılanmış kişilerde sağlık bakımı ilişkili enfeksiyonlara yol açan gram negatif fırsatçı bir patojendir. Toprak, yüzey suları ve tıbbi cihazlarda bulunan hareketsiz kapsüllü fermantatif bir bakteridir. *K. pneumoniae* idrar yolu enfeksiyonu, pnömoni, sepsis ve karaciğer enfeksiyonlarına neden olabilir. Yenidoğanlarda, hematolojik maligniteleri olan hastalarda sepsisin önde gelen nedenlerinden biridir.^{1,2} Sağlıklı bireylerin gastrointestinal sisteminde, derisinde, burnunda ve boğazında kolonize olabilir.³ Son zamanlarda ilave genetik özellikler kazanmış; hipervirülan veya antibiyotiklere dirençli *K. pneumoniae* suşlarının ortaya çıkması nedeniyle *K. pneumoniae*'ya bağlı şiddetli enfeksiyonların sayısı artmış ve tedavi etkinliği azalmıştır.⁴ *K. pneumoniae*, beta-laktam antibiyotikler, florokinolonlar ve aminoglikozitler gibi birçok antibiyotik grubuna karşı yüksek bir direnç göstermektedir.⁵

Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerden oluşan β -laktam grubu antibiyotikler global olarak yaygın bir şekilde reçete edilir.⁶ Karbapenemler, geniş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için tercih edilen β -laktamlardır.⁷ Bu antibiyotikler ayrıca hayatı tehdit eden sağlık bakımıyla ilişkili enfeksiyonların yönetimi için son çare olarak kabul edilmektedir.⁸

Antimikrobiyal direnç yaygın olarak bulaşıcı plazmidlerin yayılması ve yatay gen transferiyle ortaya çıkan ve ayrıca virülans faktörlerini de taşıyabilen direnç genlerinin edinilmesiyle ilişkilidir.⁹ Kapsül, lipopolisakkarit (LPS), fimbrialar (tip 1 ve 3) ve sideroforlar, *K. pneumoniae* patojenitesine katkıda bulunan virülans faktörleridir.² Karbapenem-dirençli *K. pneumoniae* suşlarının artan virülans ile ortaya çıkması, karbapenem-dirençli *K. pneumoniae* ve hipervirülan suşlar arasındaki ayrımı zorlaştırmıştır. *K. pneumoniae*'de karbapenem direnci ve hipervirülans arasındaki ilişkinin artışı endişe vericidir.¹⁰ Ülkemizde *K.pneumoniae*'da virülans genlerinin araştırıldığı az sayıda çalışma ulunmaktadır. Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'nin (ECDC) antimikrobiyal direncin sağlık yükü üzerine etkisini araştırdığı çalışmada, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (KdKp)'ya bağlı enfeksiyonlara atfedilen ölümlerin sayısının 2007 ile 2015 arasında altı kat arttığı tahmin edilmektedir.¹¹

Bakterilerin epidemiyolojik sınıflandırılmasında Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST) ve Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca

son yıllarda yapılan çalışmalarda Matriks aracılı lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS)'nin *K. pneumoniae* suşlarındaki klonal ilişkinin saptanmasında önemli bir yeri olduğu gösterilmiştir.^{12,13}

Bu çalışmada Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde tedavi gören hastalardan çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* suşlarında antibiyotik direnç genleri ile virölans genleri ve suşlar arası klonal ilişkisinin epidemiyolojik verilerle birlikte moleküler yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe ve Taksonomi

K. pneumoniae hareketsiz, gram-negatif, sporsuz, polisakkarid kapsülü bulunan bir basildir. *Enterobacterales* takımının üyesi olup Friedlander basili olarak da bilinir. *Klebsiella* cinsi *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* ve *K. alba* olmak üzere 6 türden oluşur.¹⁴

Drancourt ve arkadaşları 2011 yılında, dokuz *Klebsiella* türünün 16S rRNA ve rpoB genlerinin (bakteriyel RNA polimeraz β -alt birimini kodlayan) dizilerinin karşılaştırmalı bir analizini yapmışlardır ve *Klebsiella*'nın heterojen olduğunu ve üç alt küme oluşturan türlerden oluştuğunu göstermişlerdir. Bu araştırmaya göre birinci küme, *K. pneumoniae subsp. pneumoniae*, *rhinoscleromatis* ve *ozaenae* ve *K. granulomatis* içerir. İkinci kümede *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* ve *K. terrigena* bulunur ve üçüncü kümede *K. oxytoca* yer alır. Bu bilgiler ışığında, *Klebsiella* cinsinin *Klebsiella* ve *Raoultella* olmak üzere iki cinse bölünmesini ve *K. oxytoca*'nın monofiletik takson olarak bırakılması gerektiği öne sürülmüştür. Birinci kümeye dahil olan türler *Klebsiella* cinsinde tutulurken, ikinci kümeye dahil olan türler yeni cins *Raoultella*'ya aktarılmıştır.¹⁵ Daha önce *K. pneumoniae* filogrupları sırasıyla KpIII ve KpII'nin üyeleri olan *K. variicola* ve *K. quasipneumoniae*; 2004 yılında yeni tür olarak *K. pneumoniae*'dan ayırt edilmişlerdir.¹⁶

2.2.Biyokimyasal Özellikleri

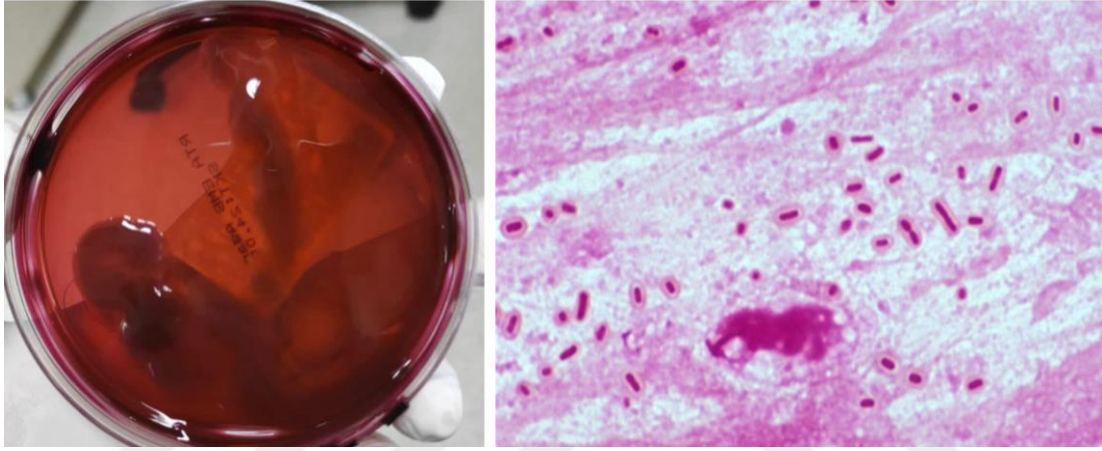
K. pneumoniae fakültatif anaerop olup glukoz, laktoz, sükrozu fermente eder ve gaz oluşturur. Voges-Proskauer (VP) ve sitratı pozitif, indol, metil red, oksidaz, H₂S negatiftir. Üreyi yavaş hidrolize eder.¹⁴

K. pneumoniae ve alt türleri (*K. pneumoniae subsp pneumoniae*, *K. pneumoniae subsp ozaenae* ve *K. pneumoniae subsp rhinoscleromatis*) 10°C'de üreyemezler. Alt türlerden *K.ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis* VP ve indol negatiftir. Cinsin diğer türlerinden biri olan *Klebsiella oxytoca*'nın indol ve VP testi pozitifdir ve 10°C'de üreyebilir.¹⁷

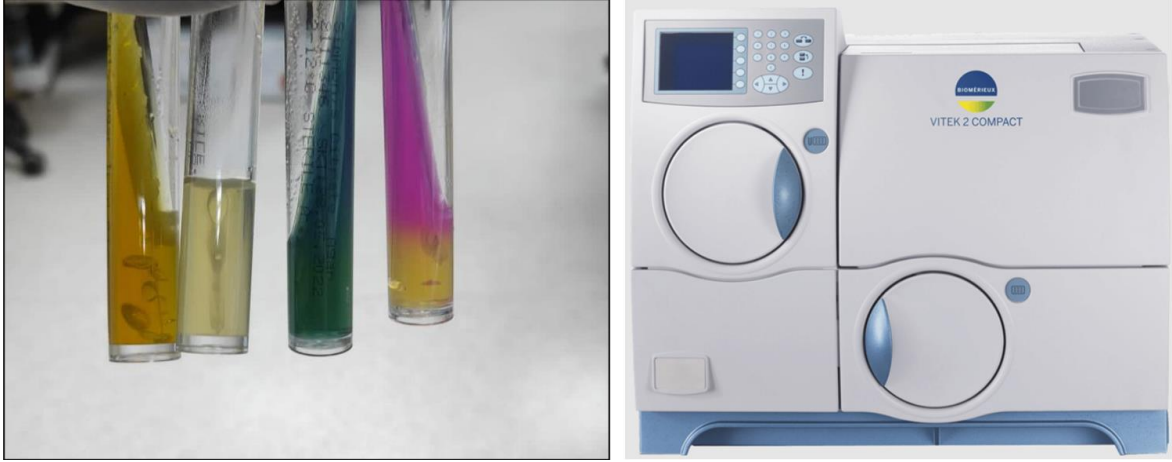
2.3.Laboratuvar Tanısı

Enterobacteriaceae tanısında mikroskopisi, besiyerinde üreme özelliği, konvansiyonel yöntemler, manuel ve otomatize tanımlama sistemleri kullanılabilir. *K.pneumoniae* mikroskopta gram negatif basil olarak görülür ve besiyerinde mukoid

koloniler oluşturur.¹⁴ Koloni görüntüsü ve gram boyaması Şekil 1’de gösterilmiştir. Konvansiyonel yöntemler arasında Triple Sugar Iron(TSI) agarda üreme özelliği , sitrat kullanım testi, üreaz üretim testi, VP, metil kırmızısı, indol üretim testi, H₂S üretimi, hareket testleri bulunur.¹⁸ Manuel tanımlama sistemleri arasında API20NE (BioMerioux, Fransa) gibi sistemler kullanılır. Otomatize sistemler arasında VITEK 2 , Phoenix BD (Becton Dickinson, USA) bulunur.¹⁹ Otomatize sistemlerden olan MALDI-TOF MS, mikroorganizmaların protein kütle büyüklüklerine göre tanımlama yapan ve kısa süre içerisinde sonuç veren bir yöntemdir.²⁰



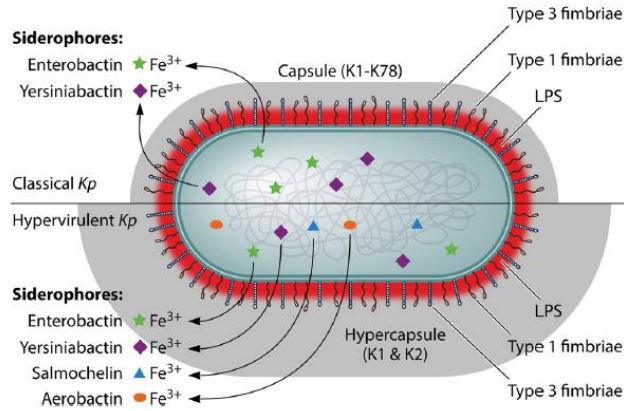
Şekil 1: EMB besiyeri mukoid koloni görünümü ve Gram boyama görüntüsü²¹



Şekil 2: Biyokimyasal testler (Sırasıyla TSI, SIM (Sülfid, İndol, Motilite), Sitrat, Üre Besiyeri) ve VITEK-2 otomatize tanımlama sistemi²²

2.4. Virülans Faktörleri

K. pneumoniae virülans faktörleri kapsül, lipopolisakkaritler, sideroforlar ve fimbriyalar olmak üzere 4 önemli unsurdan oluşur. Bunların dışında dış membran proteinleri (OMP), porinler, effluks pompaları, demir transport sistemleri ve allantoin metabolizması yer alır.²



Şekil 3: *K. pneumoniae* virülans faktörleri²

2.4.1. Kapsül

K. pneumoniae için en önemli virülans faktörü olarak tanımlanmıştır. En az 79 kapsüller (K antijen) serotipi vardır.²³ Özellikle K1 ve K2 serotipleri, artan kapsül polisakkaridi (CPS) üretimine yol açarak hipervirülan suşların oluşmasına neden olmaktadır.²⁴ Kapsül doğal bağışıklık hücrelerinin fagositik aktivitesini inhibe eder. Kompleman faktörlerinin bakteriyel membranlara erişmesini engeller.²⁵ Kapsüller polisakkarit (CPS) dendritik hücrelerin matürasyonunu zayıflatarak bu hücrelerin bakteriye bağlanmasına engel olur.²⁶ Ayrıca konak savunma peptitleri ve polimiksin antibiyotikleri gibi peptit bazlı antimikrobiyallere karşı özellikle güçlü bir bariyer oluşturur.²⁷

2.4.2. Lipopolisakkarid (LPS)

Endotoksin olarak da bilinir. Katyonik antimikrobiyal peptitlere ve bazı serotiplerde kompleman sistemine karşı koruma sağlar.²⁸ LPS, üç adet yapısal bölgeden oluşan karmaşık bir glikolipiddir. Bunlar lipid A, kor oligosakkarit ve dış tabakada bulunan hiperdeğişken O-antijenik polisakkarittir. LPS molekülleri, gram negatiflerin canlılığı için esas olup dış zar bütünlüğünü sağlar.²⁹ *K. pneumoniae*'nin LPS'i glikan bileşimi ve tekrarlayan O-antijen üniteleri yapısı nedeniyle sınırlı serotip çeşitliliği gösterir.³⁰ Şimdiye

kadar 11 farklı serotipi tanımlanmıştır. Bunlar O1, O2a, O2ac, O2afg, O3, O4, O5, O7, O8, O9 ve O12'dir.³¹

2.4.3. Sideroforlar

Demir, *K. pneumoniae*'nin gelişmesinde ve enfeksiyon oluşturmada yer alan bir metaldir. *K. pneumoniae*'da demir alımının birincil mekanizması, salgılanan demiri bağlayan ve spesifik reseptörler aracılığıyla bakteri hücrelerine girmesini sağlayan siderofor adı verilen küçük moleküllerdir. Bunlar aerobaktin, salmochelin, enterobaktin ve yersiniabaktindir. Hipervirülan suşlar 10 kata kadar daha fazla siderofor sentezleyebilirler.^{32, 33} Sideroforlardan sorumlu temel gen bölgeleri aerobaktin için *iucA* ve *iutA*, salmochelin için *iro* enterobaktin için *ent*, yersiniabaktin için *irp*'dir.²

2.4.4. Fimbriyalar

Mikroorganizmaların konakçı hücreye yapışma özelliği olan, filamenter yapıda olan fimbria türleri bulunur. Pili olarak da bilinir. *K. pneumoniae*'nin iki baskın fimbrial türü vardır. Tip 1 fimbriyalar, konakçı glikoproteinlerin D-mannoz içeren trisakaritlerine bağlanan bakteriyel adhezinlerdir. Tip 1 fimbriyalar idrar yolu enfeksiyonlarının patogeneğinde önemli bir rol oynar. Tip 3 fimbriyalar; üroepitelyal hücreler, endotel hücreleri ve solunum yolu epiteline tutunmaktadır. Tip 3 fimbria kateter gibi yüzeylerde biyofilm oluşunda da rol oynamaktadır.³⁴ Adezyonlardan sorumlu genler arasında *kpn* (Fim-H benzeri adhesin) rol alır.³⁵

2.4.5. Allantoin metabolizması

Allantoin metabolizması ile ilişkili gen (*allS*), bakterinin çevreden karbon ve nitrojen almasında ve allantoinin anaerobik yıkımından sorumludur. Genomlarında *all* genini düzenleyen kromozomal bölgeyi taşıyan suşlar, yüksek invazyon kapasitesi ve virülans ile ilişkilendirilmiştir. Bu gen, özellikle karaciğer absesine neden olan izolatlarda tespit edilmiştir. *K. pneumoniae*'ya bağlı karaciğer apseleri genelde diyabet olan Asyalı hastalarda gözükmemektedir. Bunun nedeni insüline bağımlı olmayan diabetes mellitusu olan hastalardaki yüksek allantoin seviyelerinin; K1 kapsül serotipine sahip suşlarda allantoin kullanma yeteneği sayesinde nitrojen için kaynak oluşturmada olabilir.^{36,37}

2.4.6. Hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKp)

Son yıllarda *K. pneumoniae*'nin yeni, hipervirülan bir klinik varyantı ortaya çıkmıştır. Çeşitli klinik ve bakteriyel fenotipik özellikler göstermektedir. Bu özellikler;

ayaktan gelen hastalarda görülmesi, olağandışı enfeksiyon bölgelerinde (karaciğer, göz, beyin omurilik sıvısı vb.) enfeksiyona neden olma yeteneği, metastatik yayılma yeteneği ve besiyerlerinde hipermukoviskoz kolonilerin üretilmesidir. String testi hipermukoviskoziteyi gösterir; besiyerinden öze ile koloni çekildiğinde 5 mm uzaması durumunda test pozitif kabul edilir.³⁸ Fakat hipervirülan suşların hepsinde hipermukovisköz durum gözükmebilir.³⁹ Test pozitifliği şekil 4'te örnek olarak gösterilmiştir. Bazı virülans genleri hvKp ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar K1, K2, K5, K20, K54, K57 kapsül tipleri, mucoviscosity- associated gene A (*magA*), regulator of mucoid phenotype (*rmpA* ve *rmpA2*), aerobactin geni (*iucA*) ve putative transporter *peg344* gen bölgeleridir.⁴⁰



Şekil 4: String Testi⁴¹

Klasik *K. pneumoniae* (cKp) ile farkları Tablo 1’de gösterilmiştir.

	hvKp	cKp
Epidemiyoloji	Toplum kaynaklı	Hastane kaynaklı
Coğrafi özellik	Sıklıkla Asya	Yok
Hepatik abse	Biliyer hastalıklardan bağımsız	Biliyer hastalık varlığında
İnfeksiyon bölgesi	Çoklu odaklar	Genellikle tek odaklı
Sıradışı vücut tutulumu	Endoftalmit, menenjit, beyin absesi, nekrotizan fasit, sponik abse, epidural abse	Yok
Koenfeksiyon durumu	Nadir, genelde monomikrobiyal	Özellikle abdominal, yumuşak doku, idrar yolu enfeksiyonlarında görülebilir.

Tablo 1: hvKp, cKp farkları³³

2.5. Klinik seyir ve Epidemiyoloji

K. pneumoniae klinik örneklerden sık izole edilir ve temel olarak primer pnömoniye neden olur. Nadiren normal kişilerin orofarenksine kolonize olabilir (%1-6); ancak, hastanede yatan hastalarda bu oran %20 gibi değerlere çıkabilir. Gastrointestinal *K. pneumoniae* taşıyıcılığı ortalama her ülkede %40 ile %66 arasında değişmektedir. Yüksek gelirli ülkelerde ise bu oran biraz daha düşüktür. (%6 ile %35) Hastaneye yatış taşıyıcılığı artırmaktadır ve hastane ilişkili *K. pneumoniae* taşıyıcılığı %20 ila 35 arasında değişir.⁴² Yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalarda *K. pneumoniae* enfeksiyonları incelendiğinde hastaların yaklaşık yarısının kendi suşlarıyla enfekte olduğu gösterilmiştir.⁴³

Predispozan faktörler arasında alkolizm, diabetes mellitus ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi immün sistemin baskılandığı durumlarda kolonizasyon, enfeksiyona dönüşebilir. Pnömoni, yoğun nekroz ve kanama ile seyreder, bunun sonucunda kalın, mukoid ve jölemsi balgam oluşur. Akciğer apseleri, kavitasyon ve hemoptizi şiddetli vakalarda görülebilir. Plevrit sık görülür. *K. pneumoniae*’nın akciğer dışı enfeksiyonları arasında gastroenterit, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları ve sepsisemi bulunur.¹⁴

Gelişmiş ülkelerde, toplum kaynaklı pnömonilerin (TKP) yaklaşık %3-5'ine *K. pneumoniae*'nin neden olduğu düşünülmekte, fakat gelişmekte olan ülkelerde, tüm vakaların yaklaşık %15'ini oluşturmaktadır. *K. pneumoniae* dünyadaki tüm hastane kaynaklı pnömonilerinin (HKP) yaklaşık %11,8'ini oluşturmaktadır. Ventilator ilişkili pnömonilerin (VİP) %8-12'sinde *K. pneumoniae* etkindir ancak ventile edilmeyen hastalarda %7 oranında görülür. Pnömonilerin prognozu, özellikle alkolik, diyabetik, nozokomiyal enfeksiyon veya sepsisli hastalarda kötüdür. Bu tip pnömoniden ölüm oranı %50'nin üzerinde seyretmektedir.⁴⁴

hvkp toplum kökenli ve giderek artan şekilde hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen önemli bir patojen olarak ortaya çıkmaktadır. hvkp suşları normalin aksine genellikle altta yatan hastalığı olmayan kişilerde enfeksiyona neden olur. İlk olarak Asya'da piyozenik karaciğer apselerine neden olduğu saptanmış sonrasında başka hastalıklara da yol açmıştır.⁴⁵ hvkp enfeksiyonları, %3 ila %42 arasında değişen bir mortalite oranına sahiptir. Endoftalmi ve menenjit gibi nadir olarak görülen enfeksiyonlara; vücutta çeşitli bölgelerde görülen abselere neden olabilirler. Daha çok kapsüller polisakkaritlerin K1 ve K2 serotipleri ile ilişkilidir.³²

Dünya çapında yaygın olarak görülmesinin yanı sıra *K. pneumoniae* için antibiyotik direnci de önemli bir sorun teşkil etmektedir. Ülkeler arasındaki farklılıklara rağmen, veriler *K. pneumoniae*'da tüm antibiyotik sınıflarına, özellikle de son çare ilaç olarak kullanılan karbapenemlere duyarlılığın azaldığı görülmektedir.⁴⁶ Çin'de yapılan bir sürveyans çalışmasında imipenem direncinin 2005 yılında %3 olduğu görülürken, 2019 yılında %25 lere çıktığı gözlemlenmiştir.⁴⁷ Sadece 2014 yılında dünya çapında KdKp ye bağlı 2.1 milyon şiddetli enfeksiyon gerçekleştiği tahmin edilmektedir.⁴⁸ CAESAR 2020 yılı raporunda ülkemizden kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinden elde edilen *K. pneumoniae* izolatlarında ertapenem direnci %50, imipenem/meropenem direnci ise %39 olarak bildirilmiştir.⁴⁹ Hastane kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında tahmini mortalite, karbapenem duyarlı suşlar için % 21 iken karbapenem dirençliler için % 42'dir. Bu dirençli suşlar için kısıtlı antimikrobiyal tedavi seçenekleri mevcuttur, bu da kolistinin yeniden kullanımını gündeme getirmiştir.⁵⁰

2.6. *K. pneumoniae* Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

K.pneumoniae tedavisinde birçok antibiyotik grubu kullanılır. Bu antibiyotik grupları arasında β -laktam antibiyotikler, florokinolonlar, aminoglikozidler, polimiksinler,

tigesiklin, trimetoprim-sülfametaksazol ve fosfomisin yer alır. Özellikle KdKp enfeksiyonlarında monoterapi yetersiz kalırken, mevcut ilaçlarla yapılan kombinasyon tedavileri ile daha başarılı sonuçlar elde edilmiştir.⁵¹

2.6.1.β-Laktamlar

Çoğu bakteri hücre duvarının ana yapısal bileşeni peptidoglikan tabakasıdır. β-laktamlar bu tabakadaki spesifik PBP'lere bağlanır ve peptidoglikan zincirlerinin birleşmesini engeller. β-laktam antibiyotikler genellikle bakterisidal etkiye sahiptir. Kimyasal yapısına göre dört ana gruptan oluşur. Bunlar penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar. Bu ana gruplar içinde, B-laktam halkalarına bağlı yan zincirlerdeki farklılıklar, ilacın farmakolojik özellikleri ve spektrumu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Ayrıca β-laktam /β-laktamaz inhibitör kombinasyonları da tedavide kullanılmaktadır.⁵²

2.6.1.1. Karbapenemler

Karbapenemler bakterilere karşı mevcut olan penisilin, sefalosporin ve β-laktam /β-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına kıyasla daha geniş spektruma sahiptir. Genel olarak imipenem, panipenem ve doripenem gibi farklı antibakteriyel aktiviteye sahip karbapenemler Gram pozitif bakterilere karşı etkili olurken; meropenem, biapenem, ertapenem ve doripenem Gram negatif organizmalara karşı biraz etkilidir. Karbapenemler, diğer β-laktam antibiyotiklere kıyasla β-laktamaz enzimlerine karşı daha dayanıklıdır.⁵³

2.6.2. Kolistin

Çoklu ilaca dirençli (MDR) Gram negatif bakterilerin (GNB) artması nedeniyle klinik kullanım için fazla toksik olduğu düşünülen polimiksinler gibi eski ilaçlar gündeme gelmiştir. Şu anda sadece iki grup polimiksin, polimiksin E (kolistin) ve polimiksin B piyasada bulunmaktadır. Kolistin ilk olarak 1950'lerde intravenöz olarak kullanıldı. 1959'da Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), ishal ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyon türlerinin tedavisi için bakterisidal aktivitesi nedeniyle gram negatif bakterilere karşı etkili bir ilaç olarak kolistini onaylamıştır.⁵⁴ GNB'lerde bulunan LPS, hidrofobik veya büyük antibiyotiklerin penetrasyonunu önler. Pozitif yükü nedeniyle, kolistin elektrostatik olarak GNB'lerin negatif yüklü dış membranı ile etkileşime girer ve LPS'in fosfat gruplarından kalsiyum (Ca⁺²) ve magnezyum (Mg⁺²) iyonlarını uzaklaştırır. LPS'in dengesizliği, dış zarın bozulmasına, periplazmik ve sitoplazmik içeriklerin kaybına

ve sonunda bakteriyel ölüme yol açar. 1970’lerde nefrotokisiteye bağlı kullanımı terkedilmiştir fakat günümüzde tekrar kullanıma girmiştir.⁵⁵

2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antibiyotik direnci antibiyotiklerin kullanılmaya başlandığı zamanlardan itibaren görülmektedir. Direnç, öncelikle patojenlerin ve antimikrobiyal moleküllerin doğal düzeninden veya yapısından kaynaklanır. Ek olarak, uygulanan antimikrobiyal terapötik bileşikler etkisi sonucu gelişen seçilim yoluyla direnç gelişir. Bakteriyel direnç mekanizmaları arasında hedeflenen bağlanma yerlerinde değişiklikler, ilacı etkisiz hale getiren enzimlerin üretimi, ie alım mekanizmalarının azaltılması veya efluks pompalarının güçlendirilmesi yer alır.⁵⁶

2.7.1. Karbapenem Direnci

2.7.1.1. ̢etalaktamazlar

̢-laktam halkası içeren kimyasal bileşikler hidrolize eden moleküllerdir. ̢-laktamların yaygın kullanımı, direncin ortaya çıkmasına ve yayılmasına yol açmıştır. Çoklu ̢-laktamaz üreten suşlar, direnç genlerini üzerinde barındıran plazmidler taşımaktadır. Ambler sınıflamasına göre moleküler yapı baz alınarak A, B, C ve D olmak üzere dört gruba ayrılırlar. A, C ve D grupları aktif bölgelerinde serin içerirken; B grubunda çinko iyonu bulunur ve metallo̢etalaktamaz (MBL) olarak adlandırılır.⁵⁷

Serin ̢etalaktamazlar			Metallo̢etalaktamazlar (Zn ⁺²)
A Sınıfı	C sınıfı	D sınıfı	B sınıfı
KPC GES SME TEM SHV CTX-M VEB PER	AmpC CMY DHA	OXA	IMP VIM NDM SPM SIM IND

Tablo 2: ̢etalaktamazların moleküler sınıflandırılması (Ambler Sınıflaması)^{58,59}

2.7.1.1.1. A Sınıfı Betalaktamazlar

Tüm β -laktamazlar arasında en yaygın bulunan gruptur ve en çok bu grup üzerinde çalışma yapılmıştır. Bu grupta bulunan TEM ve SHV'nin sefotaksim ve seftazidim gibi sefalosporinleri hidrolize etmesini sağlayan nokta mutasyonlarının edinimi "genişletilmiş spektrumlu betalaktamaz" (GSBL) fenotipini oluşturmuştur. Bu antibiyotiklere karşı bazı doğal aktiviteye sahip olan CTX-M enzimlerinin de mutasyonların birikmesiyle direnç spekturumu genişlemiştir.⁶⁰

Bu gruptaki karbapenemazların en önemlisi *K.pneumoniae* Karbapenemazı (KPC)dir. KPC'ler, beta-laktamaz inhibitörleri klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam tarafından kısmen inhibe edilirler. KPC üreten organizmalar; aminoglikozidlere, kinolonlara, trimetoprim, sülfonamidlere ve tetrasiklinlere dirençten sorumlu genlerle birlikte büyük plazmidler üzerinde taşındığından çoklu ilaca dirençli olma eğilimindedir. Karbapenemazlardan biri olarak GES de nadir olarak *Enterobacteriaceae*'da görülebilmektedir.^{61,62}

2.7.1.1.2. B Sınıfı Betalaktamazlar

B sınıfı MBL'lar geniş bir substrat spektrumuna sahiptir ve monobaktamlar haricinde neredeyse tüm β -laktam antibiyotiklerin hidrolizini katalize edebilir. Aktif bölgesinde çinko iyonu bulunur. A sınıfı β -laktamazlara karşı etkili olan klavulanat, sülbaktam veya tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. Karbapenemazlardan IMP, VIM ve NDM bu grupta bulunur.⁶³

2.7.1.1.3. C sınıfı Betalaktamazlar

C sınıfı β -Laktamazlar, birçok Gram-negatif türde bulunmaktadır. Fırsatçı Gram-negatif patojenlerin önemli bir kısmı, normal koşullar altında eksprese edilmeyen kromozomal *ampC* geni taşırlar. CMY, FOX ve DHA gibi enzimleri içerirler. Nadir de olsa karbapenem direncine neden olan enzimleri vardır.⁶⁰

2.7.1.1.4. D Sınıfı Betalaktamazlar

Sınıf D β -laktamazlar aynı zamanda oksasilinaz veya OXA enzimleri olarak da bilinirler. D Sınıfı β -laktamaz ailesi, şu anda tanınan 400'den fazla varyantı ile çok çeşitlidir. OXA; *Enterobacteriaceae*'daki baskın class D betalaktamazdır. OXA-48 tipi karbapenemazlar ilk olarak 2001 yılında Türkiye kaynaklı bir suşta tanımlanmış ve düşük seviyede karbapenem direnci ile karakterize edilmiştir. Bugüne kadar 11 adet OXA-48 tipi

karbapenemaz tanımlanmıştır.^{64,65} OXA-48 şu anda Türkiye'de, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde endemiktir ve bu bölge ve ülkelerdeki nozokomiyal salgınların önemli nedenlerindendir. Tn1999 adlı transpozonu barındıran plazmid ile taşınmaktadır.⁶⁶

2.7.1.2. Efflux Pompaları ve Dış Membran Protein Değişikliği

Effluks pompaları karbapenem direncinde önemli rol oynamaktadır. Bu mekanizma AcrAB-TolC efflux pompasının aşırı ekspresyonu ile gerçekleşmektedir.⁶⁷ *K. pneumoniae* dış zarı genellikle iki ana porin, yani OmpK35 ve OmpK36 içerir. Ayrıca diğer spesifik porinler yani LamB, PhoE ve OmpK37 içerir. Hem OmpK35 hem de OmpK36, antibiyotiklerin hücreye girmesinde önemli bir rol oynar ve bunların kaybı veya yapısal değişikliği karbapenemlere karşı duyarlılığı azaltır.⁶⁸

2.7.2. Kolistin Direnci

Kolistin direncinin iki temel mekanizması vardır. Bunlardan ilki kromozomal mutasyonlardır ve transfer edilemezler. PmrA / PmrB ve PhoP / PhoQ dahil olmak üzere iki bileşenli sistemlerde mutasyon ve PhoPQ'yu düzenleyen proteini kodlayan *mcrB* genindeki değişiklikler, *K. pneumoniae*'deki kolistin direncinin ana nedenidir.⁶⁹ Fakat, 2015 yılında, Çin'de insanlar, gıda hayvanları ve çevreden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında *mcr-1* geni tespit edilmiştir. Plazmid aracılı hareketli kolistin direnç (*mcr*) genlerinin ortaya çıkması ve yayılması ile çoklu ilaca dirençli GNB'lerde son çare olarak kullanılan kolistinin etkinliğini azaltmıştır. Bu durum, tüm ilaçlara dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. *mcr*'nin şu ana kadar 9 farklı türü keşfedilmiştir.⁷⁰

Türkiye'de yapılan bir çalışmada KdKp kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarında %53 kolistin direnci saptanmıştır. Ayrıca bu çalışmada ST101 en çok saptanan klon olmuştur (%67). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada ise ST101'e ait *K. pneumoniae* daha yüksek mortalite oranıyla ilişkilendirilmiştir.⁷¹ Yine ülkemizde 2016 yılında üçüncü basamak bir hastanede yürütülen bir salgın araştırmasında, kolistine dirençli *K. pneumoniae*'ya bağlı beş vakanın 14 günde mortalite oranı % 60 saptanırken, 30 günde bu oran % 100 e ulaşmıştır.⁷²

2.8. Karbapenemaz Tanı Yöntemleri

Karbapenemazlar, özellikle karbapenemlere (imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem) karşı azalmış duyarlılığa neden olduklarında, yani Minimum İnhibitör Konsantrasyonları (MİK) Avrupa Antimikrobik Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST)

tarafından tanımlanan epidemiyolojik eşik değer (ECOFF) değerlerinin üzerinde olduğunda, epidemiyolojik önemi yüksek olarak kabul edilir. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (KÜE) için karbapenem MİK'leri klinik sınır değerlerinin altında olabilir. Bununla birlikte, EUCAST tarafından tanımlanan ECOFF değerleri, karbapenemaz üreticilerini tespit etmek için kullanılabilir. Meropenem, karbapenemaz üretimini gösterme açısından en iyi duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir. Karbapenemaz üreten suşların saptanması için uygun sınır değerler Tablo 3'te gösterilmektedir.⁷³

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk Difüzyon Zon Çapları(mm) (10µg disklerle)	
	S/I sınır değeri	Tarama Eşik Değeri	S/I sınır değeri	Tarama Eşik Değeri
Meropenem	≤2	>0.125	≥ 22	<28
Ertapenem	≤0,5	>0.125	≥ 25	<25

Tablo 3: EUCAST a göre karbapenemaz üreten suşlar için sınır değerler ve tarama eşik değerleri ⁷³

2.8.1. Fenotipik Yöntemler

Karbapenemaz üreten suşların saptanması için hem fenotipik hem de moleküler temelli testler mevcuttur.⁷⁴

Fenotipik yöntemler arasında modifiye Hodge testi (MHT), karbapenemaz Nordmann – Poirel (Carba NP) testi ve varyantları, karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM) ve varyantları, kombine disk yöntemi, kromojenik agar, matriks destekli lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), yanal akışlı immünokromatografik testler yer alır.^{74,75,76}

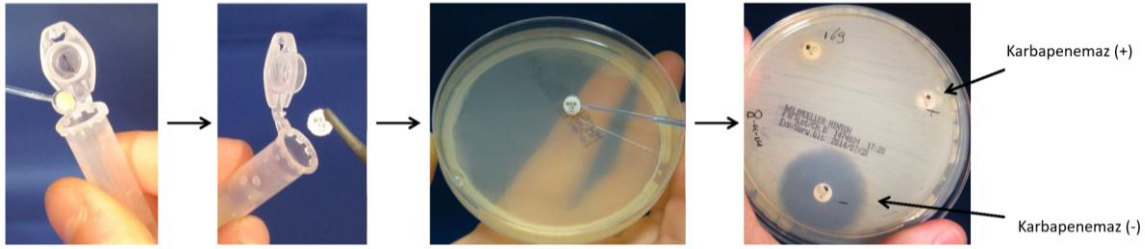
2.8.1.1. Modifiye Hodge Testi (MHT)

Karbapenemleri karbapenemaz üreten suşlar tarafından inaktivasyonuna dayanır. Bu test için duyarlı bir suş olan *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC 25922) Müller-Hinton agara (MHA) seyreltilerek ekilir. Petriler oda sıcaklığında 10 dakika bekletildikten sonra, karbapenem içeren diskler yerleştirilir. Daha sonra, test edilen bakterinin üç ila beş kolonisi öze kullanılarak diskin kenarından düz bir çizgi halinde petriye ekilir ve 36 ° C'de gece boyunca inkübasyondan sonra incelenir. Karbapenem hidroliz taraması için, *E. coli* ATCC 25922 kalite kontrol suşunun karbapenem diskine

doğru üremesi değerlendirilir. Üremenin büyüklüğüne bağlı olarak pozitif veya zayıf pozitif bir sonuç olarak yorumlanır.⁷⁷

2.8.1.2. Karbapenem İnaktivasyon Metodu (CIM)

Bu test, bir karbapenem diski ile, karbapenemaz üreten bir mikroorganizmanın sulu bir süspansiyonunda 2 saat süreyle inkübe edildiğinde, diskteki karbapenemin karbapenemaz tarafından indirgenmesi ilkesine dayanmaktadır. Eğer mikroorganizma karbapenemaz üretmezse, karbapenem diski bakteriyel süspansiyonda inkübasyondan sonra antimikrobiyal aktivitesini korur. Disk süspansiyondan çıkarılır ve karbapeneme duyarlı bir standart mikroorganizma MHA plaklarına ekilir; eğer inhibisyon zonu oluşmuyorsa, bu test edilen bakterinin karbapenemaz aktivitesi olduğunu gösterir.⁷⁸



Şekil 5: Karbapenem inaktivasyon metodu⁷⁹

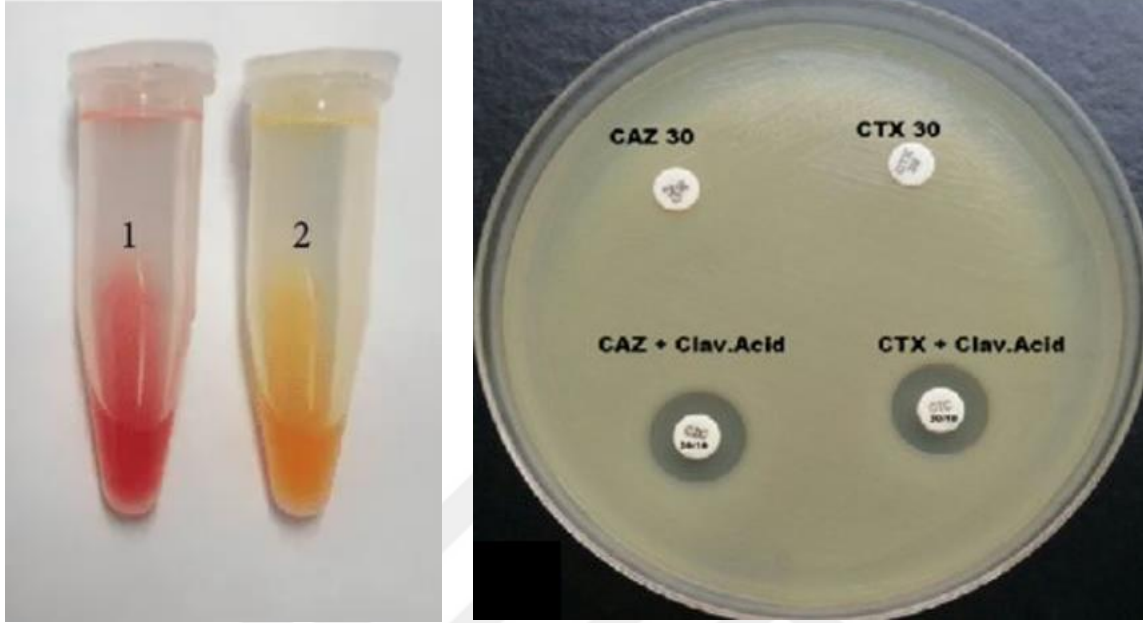
2.8.1.3. Carba NP

Karbapenemlerin beta-laktam halkasının karbapenemaz varlığında in vitro hidrolizine dayanan bir testtir. Reaksiyon sonrası açığa çıkan ürün kromojenik pH indikatörü ile tespit edilir. Test genellikle iki saat içinde sonuç verir ve kırmızıdan sarıya veya turuncuya herhangi bir renk değişikliği pozitif bir sonuç olarak yorumlanır.⁸⁰

2.8.1.4. Kombine Disk Yöntemi

Kombinasyon disk testi yönteminde karbapenem içeren diskler, çeşitli inhibitörler ile kombine edilir. Bakterinin MHA'a ekimi yapılır ve diskler yerleştirilir. 18 saat inkübasyon sonrası değerlendirilir. İnhibitör içermeyen ve içeren karbapenem diski arasındaki inhibisyon zonundaki ≥ 5 mm'lik bir fark görülmesi incelenen suşun karbapenemaz ürettiğini göstermektedir. Boronik asit A sınıfı karbapenemazları; dipikolinik asit ve etilendiamintetraasetik asit (EDTA) B sınıfı karbapenemazları inhibe eder. AmpC B-laktamazları inhibe eden kloksasilin, AmpC hiper üretimi ile porin kaybı

ve karbapenemaz üretimi arasında ayırım yapmak için testlere eklenmiştir. OXA-48, ise avibaktam tarafından inhibe edilir.^{73,81}



Şekil 6: Carba NP metodu (1: kontrol suş, 2: karbapenemaz pozitif suş) ve Kombine Disk Metodu (CAZ: Seftazidim, CTX: Sefotaksim Clav.Acid: Klavulanik asit)^{82,83}

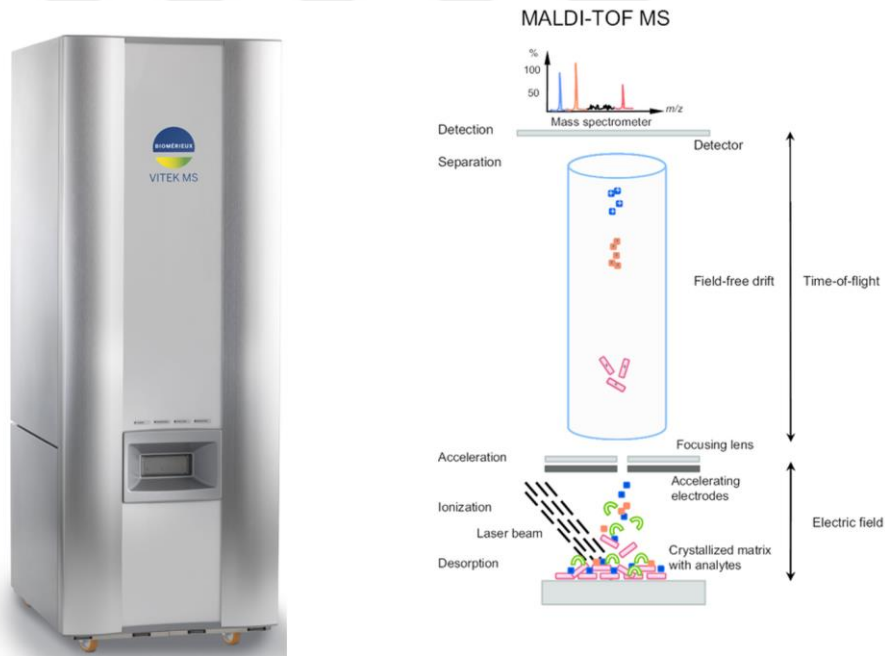
2.8.1.5. Kromojenik Agar

Karbapenem duyarlı bakterilerin büyümesini inhibe eden maddelerle desteklenen, ticari olarak hazırlanmış besiyerleridir. Ekim yapılan plakların 24 saatlik inkübasyonunun ardından, karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* kolonileri, spesifik enzimatik özelliklerine göre farklı renklerde görünür.⁸⁴

2.8.1.6. MALDI-TOF MS

Matriks aracılı lazer desorpsiyon / iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS), klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikrobiyal tanımlama için altın standart olarak kullanılmaktadır. MALDI-TOF MS, kültürde üretilen bakteri ve mantarların tanımlanması için hızlı, ucuz ve güvenilir bir araçtır. Mikroorganizmaların tanımlanmasının yanı sıra antibiyotik ve antimikotik direnç testleri de çalışılmaktadır.⁸⁵ MALDI-TOF kütle spektrumları, ribozomal proteinler gibi bakterilerde bulunan protein kütlelerini analiz ederek, bakteri türlerine ait spesifik "parmak izi" oluşturur. Bilinmeyen bir izolatın spektrumu, referans veri tabanı ile karşılaştırılarak elde edilir.⁸⁶

MALDI-TOF MS için bir bakteri kolonisinin MALDI plağına taşınması ve protein ekstraksiyonu dahil olmak üzere birkaç hazırlık yöntemi vardır. Doğrudan koloni işlemi en kolay, en hızlı ve en ucuz yöntemdir. Matriks, lazerin enerjisi aracılığıyla mikrobiyal analitlerin desorpsiyonuna ve iyonizasyonuna yardımcı olur. Matriks, analiz edilen molekülleri izole eder ve onları lazerle parçalanmaya karşı korur. Lazer tarafından mikrobiyal ve matriks molekülleri salıverilir, enerjinin çoğu matriks tarafından emilir ve iyonize hale dönüştürülür. Gaz fazında rastgele çarpışma yoluyla oluşan yük, matriksten mikrobiyal moleküllere aktarılır. İyonize mikrobiyal moleküller, kütle-yük oranına bağlı olarak, vakum altında bir tüp olan TOF (uçuş süresi) kütle analizörüne yönlendirilir. İyonlar, iyon detektörüne doğru ilerler. Küçük analitler detektöre daha önce ulaşır. Belirli bir kütlenin; zamanla iyon dedektörünü etkileyen iyon sayısını temsil eden bir kütle spektrumu oluşturulur.⁸⁷ Şekil 7’de MALDI-TOF VITEK MS (BioMerioux, Fransa) cihazı ve çalışma prensibi gösterilmiştir.



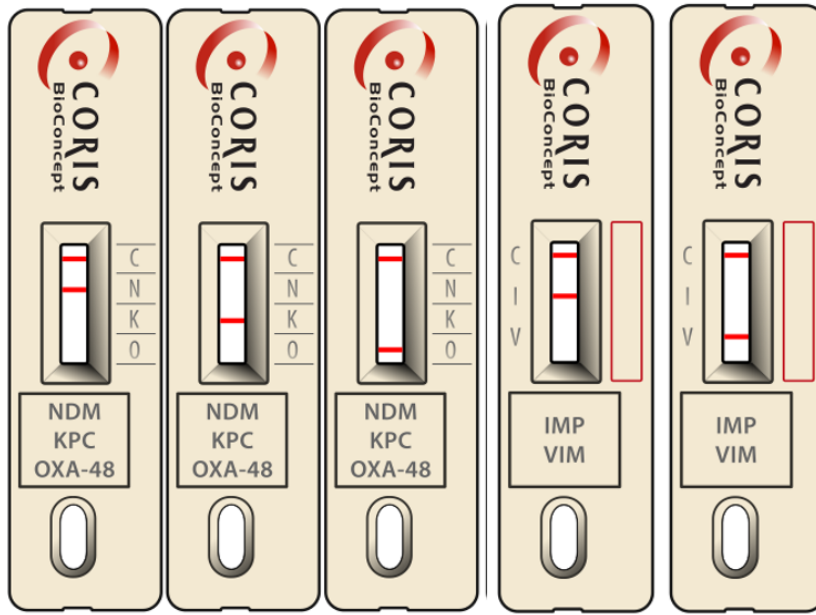
Şekil 7: MALDI-TOF VITEK MS cihazı ve çalışma prensibi^{22,88}

MALDI-TOF MS analizi ile β -laktamaz enzimi ya doğrudan ya da antibiyotiğin β -laktamaz enzimi tarafından hidrolizi ile tespit edilebilir. Doğrudan koloniden yapılabildiği gibi kan kültürleri şişelerinden yapılabilir.^{89,90} Japonya’da 2020 yılında yapılan bir çalışmada KÜE izolatları MALDI-TOF MS ile incelenmiş ve karbapenemaz saptamadaki

duyarlılığının %94,8 oranında olduğu tespit edilmiştir.⁹¹ Ülkemizde *K. pneumoniae* isolatları ile çalışmada ise MALDI-TOF MS'nin karbapenemazları saptamadaki duyarlılığı %100'e ulaştığı tespit edilmiştir.⁹²

2.8.1.7. Yanal Akımlı İmmünokromatografik (ICT) Test

Bakterilerde karbapenemaz aktivitesinin saptanması için birkaç hızlı kolorimetrik analiz artık ticari olarak mevcuttur. Bu testler, karbapenemlerin hidrolitik aktivitesinin varlığının saptanmasına izin verir, ancak karbapenemazların tam olarak tanımlanmasına izin vermezler.⁹³ Karbapenemazların hızlı ve kolay tanımlanması için farelerden elde edilen monoklonal antikorlara dayalı yan akımlı immünokromatografik testlerdir.⁹⁴ Piyasada RESIST-4 K-Set O.K.N.V. (Coris BioConcept, Belçika) ve NG-Test Carba 5 (NG Biotech, Fransa) gibi immünokromatografik testler bulunmaktadır.⁹⁵



Şekil 8: RESIST-5 K-Set O.K.N.V.I⁹⁶

2.8.2. Genotipik Yöntemler

Günümüzde çoğu mikrobiyoloji laboratuvarı, antibiyotik direnç tespiti için geleneksel yöntemleri, ardından fenotipik ve biyokimyasal doğrulama testleri kullanmaktadır. Bu yöntemler nispeten ucuz ve uygulanması kolay olmalarına rağmen, uzun sürede sonuçlanmaktadır. Moleküler bir yöntem kullanmanın en önemli yararı, sonuçların hızlı bir şekilde elde edilebilmesidir. Bu sayede enfeksiyon kontrol önlemlerinin daha hızlı uygulanması imkanı doğar.⁹⁷

Karbapenemaz genomlarının kesin varlığını kanıtlamak için standart yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanmak gerekir. Multipleks PCR yöntemleri, karbapenemazların üretken genlerini taramak için klasik PCR yöntemleri kadar uygundur ve bu yöntemler hızlı ve güvenilir yöntemler olarak kabul edilir.⁹⁸ Özellikle çoklu PCR, ilaç direnci genlerinin moleküler karakterizasyonuna odaklanan epidemiyolojik çalışmalar için daha uygundur.⁹⁹

Önceki çalışmalar incelendiğinde *K. pneumoniae*'de karbapenemaz üreten en yaygın beş gen bölgesi saptanmıştır. Bunlar; KPC, IMP, VIM, OXA ve NDM genleridir.⁹⁸

2.9. Karbapenem Dirençli *K. pneumoniae*'nin Moleküler Epidemiyolojisi

Mevcut tüm antimikrobiyal ilaçlara dirençli olan karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonlar, halk sağlığı için ciddi bir sorun haline gelmiştir.¹⁰⁰

Dünya genelinde 5 büyük karbapenemaz grubu saptanmıştır. Bunlar IMP, VIM, NDM, KPC ve OXA-48 benzeri karbapenemazlardır. *Enterobacterales* takımında ilk bulaşıcı karbapenemaz geni yaklaşık 30 yıl önce ortaya çıkmıştır. IMP-1 MBL olarak adlandırılan bu gen, Japonya'da bir *Serratia marcescens* suşunda tespit edildi ve plazmid aracılı bir salgına yol açtı.¹⁰¹ Bu gen Japonya ve Tayvan civarında endemiktir. Ülkemizde 2003 yılında ilk kez IMP üreten bir *K. pneumoniae* izolatı saptanmıştır.¹⁰² Avrupa'da yapılan 32 ülkeden 244 hastanenin katıldığı bir çalışmada saptanan IMP içeren izolatların tümü Türkiye'de tespit edilmiştir.¹⁰³ Çin'de IMP saptanan hastalarda sekans tiplerine bakıldığında 20 suştan sadece 3'ünün Sekans tipi (ST) 11'e ait olduğu geri kalan kısmının ise 18 farklı ST ailesine ait olduğu tespit edilmiştir.¹⁰⁴

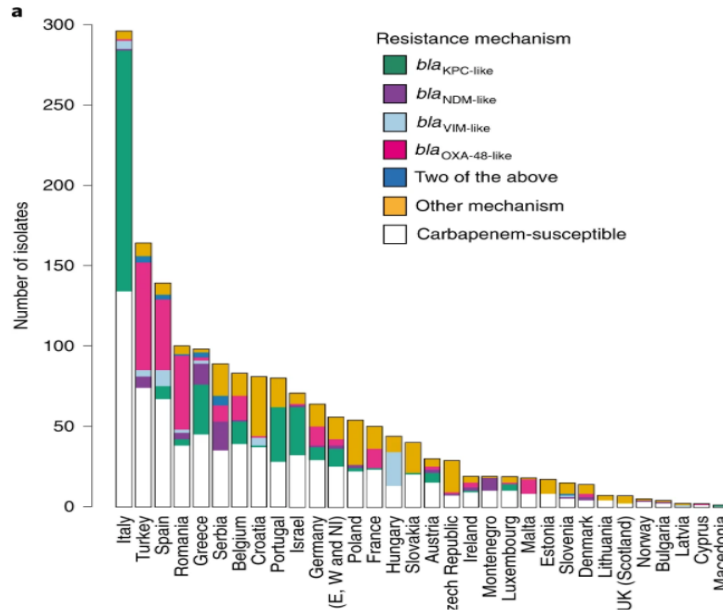
VIM ilk kez 1997 yılında İtalya'nın Verona şehrinde karbapenem dirençli bir *Pseudomonas aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir.¹⁰⁵ Ülkemizde ilk kez 2003 yılında üriner sistem örneğinden izole edilen *K. pneumoniae*'de VIM-5 saptanmıştır.¹⁰⁶ VIM *P. aeruginosa* da yaygın olarak görülürken, *Enterobacterales* içerisinde nadir olarak gözlenmektedir.¹⁰⁷ Avrupa'da kısa adı EuSCAPE olan European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* verilerine göre 2013-2014 yılları arasında *K.pneumoniae*'de temel karbapenemazlar arasında en az bulunan VIM'dir. Fakat Macaristan'da %72, Yunanistan ve Hırvatistan'da %10 oranına ulaşmıştır. Ayrıca Avrupa da 8 ülkede daha tespit edilmiştir.¹⁰⁸ İtalya'da yapılan bir çalışmada yenidoğan yoğun bakımda VIM

kaynaklı bir salgında izolatların çoğunluğunun ST104 ait olduğu belirtilmiştir.¹⁰⁹ Tunus'ta yapılan bir çalışmada ise ST 147 tipine sahip tüm suşların VIM-1 ürettiği tespit edilmiştir. Ayrıca bu klon daha önce Yunanistan'da VIM-1 ile ilişkili salgınlarda sıklıkla tespit edilmiştir.¹¹⁰

NDM-1 ilk olarak 2009 yılında New Delhi'ye seyahat eden İsveçli bir kişide idrar yolundan alınan numunede izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda saptanmıştır.¹¹¹ 2011 yılında Irak'tan ülkemize lösemi tedavi için gelen bir hastada NDM-1 saptanmıştır.¹¹² Yunanistan'da yapılan bir çalışmaya göre 2013-2016 yılları arasında toplanan ve NDM saptanan izolatların büyük çoğunluğunun ST11 ailesine ait olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar 2011'de Yunanistan'da, 2015'te Bulgaristan'da gerçekleşen NDM ilişkili salgınla uyumlu bulunmuştur.¹¹³

İlk KPC üreten izolat 1996 yılında ABD de *K. pneumoniae* de tespit edildi. Yunanistan İsrail ve ABD de endemik olarak görülmektedir.¹¹⁴ KPC dünya genelinde en sık görülen β -laktamaz olmasına rağmen ülkemizde görülme sıklığı azdır. Ülkemizde ilk kez 2012 yılında Romanya'dan gelen hastada solunum yolunun yolu örneğinde saptanmıştır.^{115,116} Çin'de yapılan bir çalışmada karbapenem dirençli 210 izolatın %98,6'sında KPC geni tespit edilmiş ve bunların %88'inin ST11 ailesine ait olduğu belirtilmiştir.¹¹⁷ *K. pneumoniae*'nin klonal kompleks 258'i (CC 258) KPC geninin dünya geneli yayılmasını sağlamıştır. Bu grupta sekans tiplerinden en sık ST258 ve varyantları (ST512 gibi) bulunmaktadır. İtalya'da 2013-2016 yıllarında toplanan suşlarla yapılan bir çalışmaya göre %87 oranında KPC saptanmış ve bunların yaklaşık %60'ının ST512'ye ait olduğu gösterilmiştir.¹¹⁸

OXA-48 2001 yılında ülkemizde görülmesine rağmen dünyada gittikçe sıklığı artmakta ve salgınlara neden olmaktadır. Türkiye, Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkeleri OXA-48 in en büyük kaynağıdır.¹¹⁹ Portekiz'de 2014-2018 yılında salgına neden olmuş ve prevalansı %87'lere kadar yükselmiştir.¹²⁰ Ülkemizde KdKp'da en sık görülen β -laktamaz olmaya devam etmektedir.¹⁰³ Kanada'da yapılan bir çalışmada 2011-2014 yılları arası toplanan OXA-48 üreten suşlarda hakim olan klonun ST14 olduğu tespit edilmiştir.¹²¹ Türkiye'de yapılan çalışmalarda OXA-48 saptanan KdKp'ların büyük çoğunluğunun ST101 klonuna ait olduğu belirtilmiştir.¹²²



Şekil 9: EuSCAPE sistemine kayıtlı karbapenem direnç mekanizmalarının dağılımı¹⁰³

2.10. Moleküler Epidemiyolojide Kullanılan Teknikler

Enfeksiyon hastalıklarının moleküler epidemiyolojisinde, mikroorganizmalar birbirleriyle karşılaştırılır. Moleküler epidemiyolojinin temel amacı, tanımlanmış bir ortamdaki mikroorganizmaların genotipik özelliklerine dayalı olarak hastalar arasındaki epidemiyolojik bir ilişkiyi tanımlamaktır. Hastalar arasındaki bulaş, klinik tablo ve prognoz için risk faktörlerini tanımlamak amacıyla mikroorganizmalar genetik olarak karakterize edilebilir. Moleküler yöntemler bu sayede, halk sağlığı problemlerini çözme konusunda müdahale veya hastalık önleme stratejisi oluşturma imkanı sunabilir.¹²³

Moleküler epidemiyolojide çeşitli tetkikler kullanılır. Bunlar temelde 3 sınıfa ayrılır. Bunlardan Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve PFGE DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi esasına dayanır. PCR bazlı metodlarda PCR-RFLP, Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (RAPD-PCR), Repetitive sequence based PCR (Rep-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR (ERIC-PCR), RFLP ve Variable number tandem repeat (VNTR) bulunur. Sekans bazlı tiplendirme yöntemlerinde ise MLST, Microarray ve tüm genom sekanslama (WGS) bulunur.¹²⁴ Ayrıca MALDI-TOF MS de son yıllarda bu amaçla kullanılan yöntemler arasına girmiştir fakat diğer tekniklerle ayırım gücü farkını inceleyen az sayıda araştırma mevcuttur.¹²⁵

2.10.1.Multilokus Sekans Tiplendirmesi (MLST)

Multilokus Enzim Elektroforezi, uzun vadeli global epidemiyolojik çalışmalarda ve hastalığa neden olma eğilimi artmış soyların belirlenmesi için kullanılan tekniklerden birisidir. Bu teknikte mikroorganizmalara ait çeşitli yapısal genlerin kodlandığı enzimler, elektroforez yapılarak ortaya çıkan paternler karşılaştırılarak tiplerin ayrımı amaçlanmaktadır. Fakat bu yöntemde laboratuvarlarda elde edilen sonuçların karşılaştırılmasının zor olması nedeniyle enzimlerin elektroforetik hareketliliklerini karşılaştırmak yerine, doğrudan temel metabolik fonksiyonlardan sorumlu “housekeeping” genlerinin dizileri karşılaştırılarak yeni bir yöntem ortaya koyulmuştur. Bu yöntem MLST adını vermişlerdir.¹²⁶

MLST, mikroorganizmalar arasındaki genetik ilişkinin saptanmasını sağlayan bir yöntemdir. Belirli lokuslardaki nükleotid dizilimlerini inceleyerek alel oluşturma prensibine dayanır. Nükleotid dizilimi bir lokustaki tüm varyasyonu ortaya çıkardığı için, lokus başına atanan alellerin sayısı oldukça yüksektir. Her izolat için sadece yedi “housekeeping” geni sekanslanır. Bu genler hücrenin temel metabolik fonksiyonlarını kodlar. Bu genlerde varyasyonlar oldukça azdır; bu sayede uzun soluklu epidemiyolojik tiplendirmeler yapılabilir. Bu diziler 450-500 bp(baz çifti) büyüklüğünde fragmanlardır. Bu DNA fragmanı uzunluğu, bir çift primer kullanılarak her iki DNA zincirinde doğru bir şekilde sekanslanabildiği ve çoğu bakteriyel patojende, popülasyondaki birçok farklı aleli tanımlamak için yeterli varyasyon sağladığı için seçilmiştir. Her gen için, farklı diziler aleller olarak atanır ve bu yedi lokustaki aleller, her izolatın ST’ni açık bir şekilde tanımlayan alelik bir profil oluşturur.^{127,128}

İzolatlar arasındaki ilişkiler, alelik profillerin karşılaştırılmasıyla belirgin hale gelmiştir. Yakından ilişkili izolatlar aynı ST'lere veya birkaç lokusta farklılık gösteren ST'lere sahiptir. MLST'nin avantajı, ST tayini için gerekli malzemelerin oldukça kolay taşınabilir olmasıdır. Bunlar kolayca taşınabilen bir DNA preparatı veya öldürülmüş hücre süspansiyonlarıdır. Protokoller ve primer dizileri elektronik ortamda kolayca paylaşılabilir ve tek izolattan yüzlerce hatta binlerce örneğe kadar ölçeklenebilir. Çeşitli prokaryotik ve ökaryotik patojenler için MLST şemaları yayınlanmıştır ve literatürde düzenli olarak ek şemalar yer almaktadır.¹²⁹

MLST alel dizileri ve ST profil tabloları, dünyanın farklı yerlerinde barındırılan veritabanlarında saklanır. PubMLST sitesi (<http://pubmlst.org>), tüm veritabanlarından veri toplar ve kolayca erişilebilir hale getirir.¹³⁰

Analiz sürecinde eBURST (Based Upon Related Sequence Types) adlı bilgisayar yazılımı kullanılır. Burada kullanılan algoritma, büyük MLST veri setlerini; ilgili ST veya klonal komplekslerin gruplarına ayırır. Bu analiz sonucu oluşan klonal kompleksler ortak bir atadan çok yakın zamanda çeşitlenen biyolojik olarak anlamlı bir ST kümesine karşılık gelir. eBURST, bakteriyel klonların nasıl çeşitlendiğini keşfetmek için kullanılabilir ve klinik önemi olan klonların ortaya çıkışına ilişkin kanıt sağlayabilir.¹³¹

2.10.1.1. Ribozomal MLST (rMLST)

Bakteriyel ribozom protein alt birimlerini (*rps* genleri) kodlayan 53 genin varyasyonunu sınıflandıran bir MLST çeşididir. rMLST, klasik MLST'de olduğu gibi ribozomal gen varyantlarının sekanslarını kullanır. *rps* lokusları tüm bakterilerde mevcut olduğundan evrensel sınıflandırma için ideal hedeflerdir. *rps* lokusları, 16S küçük alt birim rRNA gen filogenisinden önemli ölçüde daha fazla çözünürlük sağlar.¹³²

2.10.1.2. Kor Genom MLST (cgMLST)

Next Generation Sequencing (NGS)'in gelişiyile birlikte cgMLST, moleküler epidemiyolojik analiz alanında ön plana çıkmış ve son yıllarda bu alanda hızlı bir gelişme sağlamıştır. cgMLST, türlerin çoğu üyesinde korunmuş olarak bulunan binlerce (genelde 1500-4000) genin alelini kullanır, bu da geleneksel MLST'den çok daha yüksek bir çözünürlük sağlar.¹³³ cgMLST genom çapında tek nükleotid polimorfizm (SNP) çeşitliliğini ortaya koymada; WGS verilerinin SNP tabanlı analizine göre daha kullanışlıdır. Bunun nedeni daha az hesaplama yoğunluğu olan ve standartlaştırılmış bir alel numaralandırma sistemine sahip olmasıdır.¹³⁴ Bu yöntem, tüm MLST şemalarıyla geriye dönük uyumluluk ek avantajına sahiptir. cgMLST tüm housekeeping genlerini içereceğinden, herhangi bir izolatın MLST profillerinin cgMLST profillerine dayalı olarak belirlenmesi mümkündür.¹³⁵

2.10.1.3. Tüm Genom MLST (wgMLST)

wgMLST yaklaşımı, ayrı ayrı baz çifti fragmalarından ziyade izolatlar arasındaki genleri karşılaştırır. Geleneksel bir MLST yaklaşımının aksine, wgMLST, analizi bir

genomdaki hemen hemen tüm genleri kapsayacak şekilde genişletilmiştir. wgMLST şemasına dahil edilen farklı genler veya lokuslar, türlerin genetik çeşitliliğini tam olarak temsil eden izolatların iyi bir şekilde açıklanmış referans genomlardan seçilir. Lokuslar tanımlandıktan sonra, test izolatlarının grupları bu lokuslarla karşılaştırılır ve lokus bulunursa bir alel numarası atanır. Her bir alel için; insersiyonlar, delesyonlar ve SNP'ler dahil olmak üzere gen dizisindeki herhangi bir değişiklik, yeni bir alel numarasına işaret eder.¹³⁶

2.10.2.Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

Agaroz bazlı DNA elektroforezi, moleküler biyolojide en sık kullanılan tekniklerden biridir. Geleneksel jel elektroforez teknikleri kullanılarak; kromozomal DNA molekülleri ile doğrudan genomik analiz veya çok büyük restriksiyon fragmanları ile çalışmak mümkün değildir. Schwartz ve ark., bu sınırlamaları aşmak için 1983'te PFGE yöntemini geliştirmiş ve büyük DNA moleküllerini restriksiyon enzimleri ile parçalara ayırıp bir hat üzerinde dizebileceğini göstermiştir.¹³⁷

PFGE kullanımı epidemiyolojik veya genetik ilişkileri belirleyebilir. Çalışmalar, PFGE'nin suşlar arasındaki farklılaşmada ve bakteriyel salgın olasılığını araştırmada yüksek hassasiyete sahip olduğunu göstermektedir. PFGE tiplendirmesi; epidemiyolojik olarak ilişkili olan hastalardan, çevreden veya hayvanlardan izole edilen suşların ortak bir kaynaktan çıkmış olabileceğini gösterebilir.¹³⁸

Bu teknik, agaroz jele göre periyodik olarak yön veya yoğunluğu değiştiren bir doğru akım elektrik alanına dayanır. Basit bir ifadeyle, büyük DNA molekülleri, elektrik alanındaki değişikliklere yanıt olarak zig-zag yaparak agaroz matriksinden geçer. Kısa atım süreleri daha küçük DNA moleküllerin göç etmesine izin verirken daha büyük DNA molekülleri daha buna yanıt veremez ve daha arkada kalmak üzere dizilirler.¹³⁹

Tipik bir PFGE sistemi bir güç kaynağı ünitesi, bir elektroforez tankı ve bir soğutma modülünden oluşur. PFGE sonuçlarının görüntülenmesi için bir jel dokümantasyon sistemi gerekir. PFGE sisteminden veri çıkışı elektroforez bantları şeklinde görülür. Jel üzerinde birçok örnek çalıştırıldığında veya farklı jellerden örnekler karşılaştırıldığında analizi kolaylaştırmak için, belirli bir PFGE modelinin sayısal temsilini atamak için algoritmalar geliştirilmiştir. Bundan dolayı karşılaştırılan bant modellerinin aynı protokol ve referans standart kullanılarak oluşturulması gerekir.¹²⁵

PFGE, analiz edilen her numunenin DNA parmak izini ortaya çıkararak, bakteriyel genomun %90'ından fazlasının DNA fragmanlarını bant modellerinde gösterebilir. Her bir bakteriyel izolata, genomunun PFGE tarafından analizine dayalı olarak spesifik bir alt tip oluşturmaya imkan sağlayan bir sonuç elde edilir. Eğer mevcut protokol tam olarak uygulanabilirse, bir izolatin DNA bantı profili her zaman stabil ve tekrarlanabilir özelliktedir. PFGE sonuçları; izolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişki ile mükemmel bir uyumluluğa sahiptir, ancak gerçek bir filogenetik ilişki sağlamazlar. PFGE'nin ana sınırlaması, kültürü yapılamayan mikroorganizmalara uygulanamamasıdır.¹⁴⁰

PFGE'yi etkileyen faktörler arasında vuruş süresi, voltaj, uygulama açısı, agaroz tipi ve konsantrasyonu, değişme aralığı, sıcaklık ve restriksiyon enziminin özelliği yer alır.¹⁴¹

2.10.2.1.PFGE Çeşitleri

Rotating Gel Electrophoresis (RGE)

Orthogonal Field Alternation Gel Electrophoresis (OFAGE)

Transverse Alternating Field Electrophoresis (TAFE)

Clamped Homogeneous Electric Field Electrophoresis (CHEF)

Field Inversion Gel Electrophoresis (FIGE)

Simultaneously tangential/rectangular inversion decussate electrophoresis (ST/RIDE)¹⁴²

2.10.2.2.CHEF Sistemi

CHEF cihazı çok sayıda DNA örneklerini düz çizgiler halinde homojen elektrik alanı oluşturan çoklu elektrotlar kullanılarak ayırtmaktadır. Elektrik alanının yönünü elektrotlara uygulanan akımın yönü ile elektronik olarak değiştirir. CHEF sisteminde reoryantasyon açısı 120°'de sabittir ve iki alternatif elektrik alanı jel boyunca homojendir. Voltaj, karmaşık bir elektronik devre aracılığıyla altıgen olarak dizilmiş kapalı bir elektrot etrafında elde edilir. Sonuç olarak, moleküllerin göçü jel boyunca sabittir, bu sayede jelde geniş aralıkta DNA moleküllerinin uygun bir çözünürlüğü elde edilir. Bu da bantlar arasında daha güvenilir karşılaştırmalara olanağı sunar.¹⁴³

2.10.2.3.PFGE Analizi

Test edilen örneklerin bant profilleri, bakteriyel klonal ilişkiyi belirler. Tenover ve arkadaşlarının PFGE bantlama profillerinin yorumlanmasında yaygın olarak kullanılan kriterlerine göre, "yakın ilişkili" bakteri suşları PFGE bantlama desenlerinde iki ila üç bant farkı vardır, dört ila altı bant farkı olan suşlar "muhtemel ilişkili"dir ve yedi veya daha fazla bant farkı, suşların ilişkisiz olduğuna işaret eder.¹⁴⁴

PFGE bant desenlerinin görsel gözlem ilk izlenim için yeterli olabilse de, karşılaştırılan modeller arasındaki fiziksel mesafe arttıkça (yani bir jelde veya farklı jeller üzerinde çok yakın olmadıkça) kullanışlılığı giderek daha sınırlı hale gelir. Bu nedenle, BioNumerics ve GelCompar (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belçika) gibi bilgisayar destekli analiz için ticari olarak mevcut programlar geliştirilmiştir.¹⁴⁰

2.10.3.Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon / İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS)

Moleküler tabanlı tiplendirme yöntemleri çoğunlukla DNA restriksiyonu veya amplifikasyonuna dayanır (PFGE veya MLST gibi).¹⁴⁵ Bu teknikler geniş çapta kabul edilmesine rağmen, zaman alıcı, maliyetli ve yoğun emek gerektirir. MALDI-TOF MS ise oldukça kısa bir numune hazırlığı ile verileri doğrudan analiz ederek, hızlı, otomatik ve ucuz bir şekilde moleküler tiplendirme yapabilir. Genel olarak, kütle spektrumları, cinslere, türlere ve suşlara özgü pikler oluşturur. Pik biyobelirteçleri, spektrumların basit görsel analizi veya tüm spektrumların bilişim ve istatistiksel analiz ile daha karmaşık analizi ile tanımlanır. İki izolat arasındaki benzerlik seviyesi, piklerin çeşitli parametrelerini (pik varlığı veya yokluğu, pik yoğunlukları) analiz eden birkaç benzerlik katsayısı veya algoritması ile hesaplanır.^{87,146} Ayrıca bu tiplendirme, bakteri tanımlanması dışında herhangi bir ek maliyet gerektirmemektedir. İsrail’de yapılan bir çalışmada yenidoğan yoğun bakımdan izole edilen ESBL üreten *K. pneumoniae* suşlarının MLST ve MALDI-TOF MS ile epidemiyolojik tiplendirme özellikleri karşılaştırılmış ve sonuçların uyumlu olduğu tespit edilmiştir.¹⁴⁷ Çin’de 71 adet KdKp suşu ile yapılan başka bir çalışmada ise MALDI-TOF MS analizi ile 11 kütle spektrometresi (MS) tipi tanımlanmıştır. Neredeyse tüm ST11 izolatları; MADi-TOF MS tiplerinin %53,5’ini oluşturan MS4 ve MS6 ile eşleştiği tespit edilmiştir.¹

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Çalışmada Kullanılan İzolatlar

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Aralık 2017 ile Aralık 2020 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden izole edilen VITEK-2 (BioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile tür tayini ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmış olan, karbapenem (ertapenem, meropenem, imipenem) grubu antibiyotiklerden herhangi birine orta duyarlı ya da dirençli olarak saptanan karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* izolatlarıdır. Toplanan suşlar, tanımlama ve duyarlılık testleri sonrasında moleküler mikrobiyolojik yöntemler gerçekleştirilinceye kadar %20 gliserol (Carlo Erba, Fransa) içeren Luria-Bertani (LB) besiyerinde -80°C'de stoklanmıştır.

3.2.Besiyerleri

3.2.1.Hazır Petri Koyun Kanlı Agar (%5) Besiyeri

Bilimsel Araştırma Projesi kapsamında marka hazır petrilerin (Laborlar, Türkiye) hizmet alımı yapıldı. Kullanılana kadar +4°C'de saklandı.

3.2.2.Eozin-Metilen Blue (EMB) Agar

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

3.2.3.Gliserol (%20) içeren LB Besiyeri

LB besiyeri; Tryptase (Conda Pronadisa , İspanya) agar %1 oranında, Yeast Extract (Conda Pronadisa , İspanya) %0,5 oranında, NaCl (Sigma, ABD) %1 oranında katılarak hazırlanmıştır. Besiyerinin %20'si oranında gliserol (Carlo Erba, Fransa) içerecek şekilde hesaplanarak eklendi. 121°C'de 15 dakika sterilizasyon işleminin ardından aseptik şartlarda steril 1.5 ml'lik ependorf tüplerine 1 ml besiyeri dağıtıldı.

3.2.4.Müller-Hinton Agar (MHA)

MHA (Himedia, Hindistan) ticari olarak satılan toz besiyerinden üretici firmanın önerisi doğrultusunda hazırlandı ve 121°C'de 15 dakika steril edilip 45–50°C'ye kadar

soğutuldu. Aseptik şartlarda 50 ml besiyeri, plastik petrilere döküldü ve kullanılıncaya kadar +4°C’de saklandı.

Çözelti	Hazırlanışı
Tris-HCl (1 M, pH 8.0) Stok	157.6 g Tris tartılıp distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır. HCl ile pH 8.0’a ayarlanır. (Otoklavlanır)
EDTA (1 M, pH 8.0) Stok	372.4 EDTA tartışıp distile su ile 1000 ml’ye tamamlanır ve NaOH pelletleri ile pH 8.0’a ayarlanır. (Otoklavlanır)
Etidyum Bromür (10 mg/ ml stok)	200 µl Etidyum bromür 400 ml diH ₂ O
TE	20 ml Tris (1 M, pH 8.0) ve 4 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) 2000 ml’ye kadar distile su ilave edildi. (Otoklavlanır)
HST: Hücre Süspansiyon Tamponu	100 ml Tris (1 M, pH 8.0), 200 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) 1000 ml’ye kadar distile su ilave edildi. (Otoklavlanır)
Kesim tamponu (10X buffer, 10 U /µl <i>Xba</i> I)	10 µl 10x <i>Xba</i> I tamponu + 2 µl <i>Xba</i> I enzimi (10 U /µl) + 88 µl steril ultra saf su (Her bir izolat için)
Hücre lizis solüsyonu-1(HLS-1) (50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + %1 Sarkozil + 100 Lizozim + 0,1 mg/ml proteinaz K)	50 ml Tris (1 M, pH 8.0), 100 ml EDTA (0.5 M, pH 8.0) ve 100 ml %10 Sarkozil (N-Lauroylsarcosine Sodium salt) 750 ml steril distile su ile karıştırıldı. Çalışma anında gereken miktarda solüsyona, kullanımdan hemen önce, son konsantrasyon 0,1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
Hücre lizis solüsyonu-2(HLS-2) (0.5 M EDTA+ %1 Sarkozil + 0,1 mg/ml proteinaz K)	50 ml Tris (1 M, pH 8.0), 100 ml %10 Sarkozil (N-Lauroylsarcosine Sodium salt) Çalışma anında gereken miktarda solüsyona, kullanımdan hemen önce, son konsantrasyon 0,1 mg/ml olacak şekilde Proteinaz K (20 mg/ml) eklendi.
Sarkozil	10 g Sarkozil (N-Lauroylsarcosine, Sodium salt) tartılıp, 80 ml distile suda çözülerek 100 ml’ye tamamlandı.
TBE 10X	108g Tris-base, 55 g borik asit ve 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1000 ml’ye kadar distile su ilave edildi. (Otoklavlanır)
TAE 50X	242 g Tris, 57.1 ml glisyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) 1000 ml’ye kadar distile su ilave edildi.

Tablo 4: Kullanılan Çözeltiler

3.3.Antibiyotik Duyarlılık Testi

Tür düzeyinde tanımlanması ve -80°C stokları yapılmış olan bakterilerden %5 koyun kanlı agar besiyerine aseptik koşullarda tek koloni ekimi yapıldı. Etüvde 37°C’de 20–24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edilerek tek koloniden EMB besiyerine pasaj yapıldı. Daha sonrasında saf koloni steril SF içinde süspanse edilerek yoğunlukları 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlandı. Belirlenen antimikrobiyaller olan 10µg meropenem ve 10µg imipenem disk (Oxoid, Thermo, ABD) her bir suş için duyarlılıkları Kirby–Bauer disk difüzyon yöntemi ile saptanıp, EUCAST sınır değerlerine göre değerlendirildi.^{148,149}

3.4.Virülans ve Antibiyotik Direnç Genlerinin Saptanması

3.4.1.Suşların Canlandırılması

Tür düzeyinde tanımlanması ve -80°C stokları yapılmış olan bakterilerden %5 koyun kanlı agar besiyerine aseptik koşullarda tek koloni ekimi yapıldı. Etüvde 37°C’de 20–24 saat aerobik koşullarda inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edilerek tek koloniden EMB besiyerine pasaj yapıldı.

3.4.2.DNA İzolasyonu

Karbapenemaz genlerini belirlemek amacı ile gerçekleştirilecek PZR için DNA izolasyonu, kaynatma metodu ile gerçekleştirildi.

Bakteriler tek koloni düşürme yöntemi ile EMB agara ekildi. Bu kültürden saf bir koloni, LB besiyerine pasajlanarak 36°C’de 18 saat çalkalamalı etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 1 ml lik mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Kısa süreli vortekslenerek bir dakika 13000 rpm’de santrifüjlendi. Dipteki pelete dokunmadan üstteki sıvı faz tamamen çekildi. Peletin üzerine 1 ml steril saf su ilave edilip vorteklenerek çözüldü. Santrifüjleme ve steril suda çözme işlemi iki kez tekrar edildi. Elde edilen bakteri süspansiyonu kuru ısıtıcı bloğunda (HLC Biotech, Almanya) 95°C’de 10 dakika inkübe edildi. Süre sonunda mikrosantrifüj tüpleri 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, 10 dakika soğutmalı santrifüjde (+4 °C) 10000 rpm’de santrifüjlendi. DNA içeren üst sıvı kısmından 450 µl steril bir mikrosantrifüj tüpüne alınıp etiketlendi. Elde edilen DNA, kullanılana kadar -80 °C’de saklandı.

Reaktifler	Reaksiyon başına miktar (µl)
Buffer (10X) (Thermo Scientific, ABD)	2,5
MgCl ₂ (25mM) (Thermo Scientific, ABD)	1,5
dNTP (10 mM) (Thermo Scientific, ABD)	0,5
Primer-F (10 pm)	0,25
Primer-R (10 pm)	0,25
Taq Polimeraz (Thermo Scientific, ABD)	0,1
RNAse, DNAse free distile Su	18,9
DNA	1
Toplam Hacim	25

Tablo 5: PCR Karışımındaki reaktif miktarları

3.4.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin PCR ile Araştırılması

Klinik örneklerde en yaygın görülen 11 adet B-laktamaz geni In-house PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu aşamada kullanılan primerler Tablo 6’da verilmiştir.

Primer Adı	Primer Dizisi	Amplikon Büyüklüğü (Baz Çifti)	Tm	Referans
<i>bla</i> _{TEM}	F: AGTATTCAACATTTTCGTGT R: TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	847	56 °C	150
<i>bla</i> _{SHV}	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R: TTAGCGTTGCCAGTGCTC	843	55°C	151
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	F: GCGTGATAACCACTTCACCTC R: TGAAGTAAGTGACCAGAATC	260	55°C	152
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	F: TGATACCACCACGCCGCTC R: TATTGCATCAGAAACCGTGGG	341	55°C	152
<i>bla</i> _{GES}	F: ATGCGCTTCATTCACGCAC R: CTATTTGTCCGTGCTCAGGA	863	56°C	153
<i>bla</i> _{PER}	F: ATGAATGTCATCACAAAATG R: TCAATCCGGACTCACT	927	50°C	154
<i>bla</i> _{KPC}	F: ATGTCACTGTATCGCCGTCT R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893	55°C	155
<i>bla</i> _{IMP}	F: CATGGTTTGGTGGTTCTTGT R: ATAATTTGGCGGACTTTGGC	488	56°C	156
<i>bla</i> _{VIM}	F: ATTGGTCTATTTGACCGCGTC R: TGCTACTCAACGACTGAGCG	780	58°C	156
<i>bla</i> _{NDM}	F: GAGATTGCCGAGCGACTTG R: CGAATGTCTGGCAGCACACTT	497	57°C	157
<i>bla</i> _{OXA-48}	F: GCGTGGTTAAGGATGAACAC R: CATCAAGTTCAACCCAACCG	442	52°C	158

Tablo 6: Antibiyotik direnç genleri için kullanılan primer dizileri, amplikon büyüklükleri(bp) ve primer bağlanma sıcaklıkları (Tm)

3.4.4. Virölans genlerinin PCR ile Araştırılması

Özellikle hipervirölans suşlarda yaygın olarak görülen virölans faktörlerine ait bazı gen bölgeleri In-house PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Bu aşamada kullanılan primerler Tablo 7’de verilmiştir.

Primer Adı	Primer Dizisi	Amplikon Büyüklüğü (Baz Çifti)	Tm	Kaynak
<i>magA</i>	F: GGTGCTCTTTACATCATTGC R: GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1282	58 °C	35
<i>rmpA</i>	F: ACTGGGCTACCTCTGCTTCA R: CTTGCATGAGCCATCTTTCA	535	50 °C	35
<i>kpn</i>	F: GTATGACTCGGGGAAGATTA R: CAGAAGCAGCCACCACACG	626	55 °C	35
<i>allS</i>	F: CCGAAACATTACGCACCTTT R: ATCACGAAGAGCCAGGTCAC	508	58 °C	35
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	300	66 °C	35
<i>iucA</i>	F: AATCAATGGCTATTCCCGCTG R: CGCTTCACTTCTTTCACTGACAGG	239	59 °C	40
K1	F: GTAGGTATTGCAAGCCATGC R: GCCCAGGTTAATGAATCCGT	1047	55 °C	159
K2	F: GACCCGATATTCATACTTGACAGAG R: CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	641	58 °C	4
K5	F: TGGTAGTGATGCTCGCGA R: CCTGAACCCACCCCAATC	280	58 °C	4
K20	F: CGGTGCTACAGTGCATCATT R: GTTATACGATGCTCAGTCGC	741	58 °C	4
K54	F: CATTAGCTCAGTGGTTGGCT R: GCTTGACAAACACCATAGCAG	881	58 °C	4
K57	F: CTCAGGGCTAGAAGTGTCAT R: CACTAACCCAGAAAGTCGAG	1037	58 °C	4

Tablo 7: Virölans genleri için kullanılan primer dizileri

3.4.5. Amplifikasyon Koşulları

Amplifikasyon için TC-5000 PCR System (Techne, ABD) ve AB PCR System (Applied Biosystems, Singapur) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon tüpleri cihaza yerleştirilerek 94°C’de 3 dakikalık ilk denaturasyonun ardından, 94°C’de 30 saniye denaturasyon, primer bağlanması için Tm 30 saniye ve 72°C’de 1 dakika uzama ile toplam 35 siklus ve son uzama olarak 72°C’de 10 dakika olacak şekilde uygulandı.

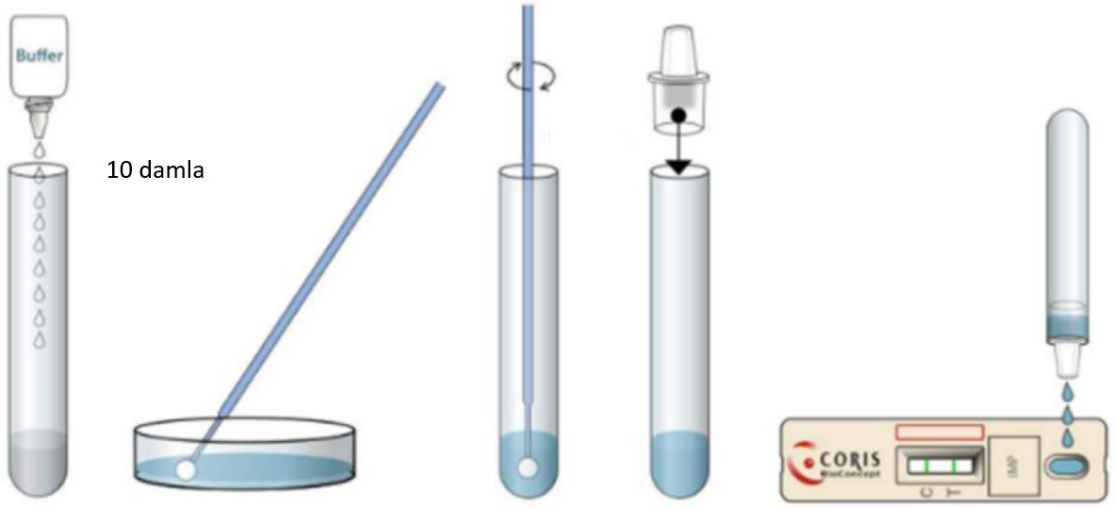
3.4.6.Elektroforez ve Görüntüleme

PZR ürünlerinin gözlemlenmesi için yatay jel elektroforezi kullanıldı. Elektroforez için Tris-Asetik Asit-EDTA (TAE) tamponu içerisinde %1'lik agaroz jel hazırlandı. Temiz bir erlen mayer balonu içerisinde 100 ml 1X TAE tamponu içerisine 1 g agaroz (Sigma, ABD) koyulup total hacim 1X TAE tampon ile 100 ml'ye tamamlandı. Mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtıldı. Jel sıcaklığı yaklaşık 50–55°C'ye düştüğünde, içerisine son konsantrasyon 0.5 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik stok Etidyum Bromür solüsyonu ilave edildi. Taraklar elektroforez yatağına yerleştirildikten sonra agaroz içersine döküldü ve yaklaşık 30 dakika katılaşmaya bırakıldı.

Agar katılaştıktan sonra taraklar çıkarılarak, jel yatak ile birlikte tanka (Clever Scientific, İngiltere) yerleştirildi. Jelin üzeri kapanacak şekilde 1X TAE tamponu ilave edildi. İlk kuyucuğa GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific, ABD) diğer kuyucuklara ise örnekler ve negatif kontrole ait PZR ürünleri 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific, ABD) ile karıştırılarak (2 µl boyaya 8 µl ürün) yüklendi. Elektroforez 100 V'da 60 dakika yürütülen örnekler DNR Bio Imaging System (MiniLumi, İsrail) jel görüntüleme sisteminde görüntülenerek değerlendirildi.

3.4.İmmünokromatografik Test (ICT)

Elimizde bulunan 12 adet RESIST-4 O.K.N.V ve IMP K-set (Coris BioConcept, Belçika) immünokromatografik test kiti ile 12 adet suşta kit önerilerine uygun bakılmıştır. Bir yarı sert tüp içine 10 damla LY-A tamponu eklendi. Tek kullanımlık bakteriyolojik öze ile bir koloni olarak bakterileri toplandı ve tüp içinde tampon ile vorteksenerek homojenize edildi. Kasetin numune kuyusuna yavaşça 3 damla damlatıldı. En fazla 15 dakika içinde sonuçlar okundu.



Şekil 10: ICT test protokolü⁹⁶

Kontrol çizgisi çalışmayan numuneler tekrarlandı. Test çizgisindeki çizgi oluşumu pozitif olarak kabul edildi.

3.5. Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon

VITEK-2 antibiyogram sonuçlarına göre elimizde 13 adet kolistin dirençli suş bulunmaktadır. Bu suşlar Colistin MIC Plate Kit (Diagnostics, Slovakia) kullanılarak çalışıldı. Ürün farklı konsantrasyonda kolistin içeren kuyucuktan ve bir adet kontrol kuyucuğundan oluşmaktadır. 18-24 saatlik saf kültürden iyi izole edimiş koloniler alarak, steril salinli bir tüp içinde 0.5 McFarland yoğunlukta homojen bir süspansiyon hazırlandı. Bakteriler taze hazırlamış olduğunuz 0.5 McFarland süspansiyondan 60 µl alınarak Süspansiyon Medyum (Katyon ayarlı Müller Hinton Broth-Ref 4001)'a inoküle edildi. Karışım hafifçe çalkalanarak ve 4-5 kez ters düz edildi. Hazırlanan son süspansiyondan kit içindeki ayrılabilir formattaki 8'li sıra halindeki test pleytinin her kuyucuğuna 100 µl bakteri süspansiyonunu inoküle edildi. Mikrodilüsyon plağı kilitli bir poşet içerisine koyulup 36°C sıcaklıkta 16-20 saat inkübe edildi. Pembe renklenme üreme var olarak kabul edildi. Mavi-mor renklenme ise üreme yok olarak kabul edildi. MİK değeri, kontrol kuyucuğundan belirgin olarak farklı renkte olan ilk kuyucuktaki konsantrasyon olarak kabul edildi. Kontrol kuyucuğunda *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

3.6.Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

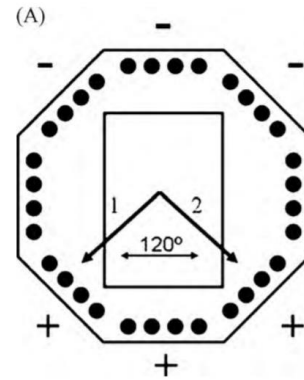
Çalışmamızda Durmaz ve arkadaşlarının PFGE protokolü modifiye edilerek uygulandı.¹⁶⁰

K.pneumoniae suşları ilk olarak canlandırmak amacı ile stok besiyerinden EMB agara pasajlandı. Saf kolonilerden MHA'a pasaj yapıldı ve 36°C'de gece boyunca inkübe edildi. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile 1 ml HST içinde süspanse edildi ve bakteri yoğunluğu McFarland 4 olacak şekilde ayarlandı. Hücre süspansiyonu, 11.200 rpm'de 4°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında süpernatant atıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklendi ve homojenize oluncaya kadar vortekslendi. HST'nden 10 ml alınarak içerisine 0,2gr low melting agar (Bio-rad, ABD) eklendi ve mikrodalga fırında eritildi. Daha sonra üzerine 1 ml %10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS) eklenerek yavaşça karıştırıldı. 55°C'deki kuru ısı bloğuna yerleştirildi. Agaroz-SDS karışımından 100µl alınarak kuru ısı blok üzerinde bulunan ependorf tüplere dağıtıldı. Sonrasında bakteri süspansiyonundan 100µl alınarak, kuru ısı bloğunda bekleyen 100µl agaroz SDS karışımı ile pipetaj ile homojen olarak karıştırıldı. Bekletilmeden, hücre-agaroz-SDS karışımından agaroz kalıp aparatına dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılaşmaya kadar +4°C'de bekletildi. Her agaroz kalıp için 0,5 ml HLS-1 solüsyonu hazırlandı. HLS-1'e alınan kalıplar 37°C'de 1,5 saat çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi (Mermert Wnb-14, Almanya). İnkübasyon sürecinden sonra HLS-1 solüsyonu dökülerek, yerine 0.5 ml hücre HLS-2 eklendi ve 55°C'de 2,5 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. Lizis aşamasından sonra yumuşayan agaroz kalıplarının hızlıca soğuması için tüpler buz içerisinde 10 dakika bekletildi ve lizis solüsyonu döküldü. Daha sonra kalıplar 55°C'de 2ml steril ultra saf su içerisinde çalkalamalı su banyosunda her yıkama 15 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı. Daha sonra agaroz kalıpları 55°C'de 2 ml Tris EDTA(TE) tamponuyla yine her yıkama 15 dakika olmak üzere 3 kez yıkandı. Son olarak örnekler 2 ml TE içerisine eklenerek +4°C'de saklandı. Ertesi gün agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistürlü yardımıyla 1/3 oranında kesildi. Oluşan parça 100 µl 1x XbaI tamponu içine alınarak 37°C derece etüvde 15 dakika bekletildi ve daha sonra bu tampon boşaltıldı. Her agaroz kalıbı için enzim karışımı hazırlandı. (10 µl 10x XbaI tamponu + 2 µl XbaI enzimi (10 U /µl) + 88 µl steril ultra saf su) Agaroz kalıbına bu karışım eklenerek etüvde 37°C'de 2,5 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi. Daha sonra 2 litre 0.5x Tris Borik Asit EDTA (TBE) buffer hazırlandı ve içerisinden 100 ml

ayrılarak kalan tampon elektroforez tankına döküldü. Ayrılan 100ml tampon içersine 1 gr pulsed-field agaroz (Bio-Rad, ABD) eklenerek %1'lik agaroz hazırlandı ve mikrodalga fırında eritildi. Agaroz dökülecek kaset hazırlandı, XbaI ile kesilmiş olan agaroz kalıpların her biri tarak dişlerinin uç kısmına yerleştirildi. Tarağın kenar ve ortasındaki dişlerine marker kalıplar yüklendi ve agaroz dökülecek kaset içine yerleştirildi. Agaroz dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20 dakika katılaşmaya bırakıldı, dikkatlice tarak çekildi ve elektroforez tankına yerleştirildi. Daha sonra CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad, ABD) elektroforez koşulları ayarlandı.

Elektroforez şartları: Başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120°, akım 6 V/cm², sıcaklık 14°C, elektroforez süresi 20 saat (TBE tamponu pH=8.0).

Elektroforezden sonra jel, 5 µg/ml etidyum bromür içeren 500 ml didistile su içine alındı ve 20 dakika boyandı. Boyadan sonra dekolizasyon için jel, 500 ml saf su içerisinde 10 dakika bekletildi. UV görüntüleme cihazı (Mini Lumi, İsrail) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi. Jel görüntüleri Tenover kriterlerine göre suşlarının birbirleriyle olan DNA bant profilleri arasındaki ilişki gözle değerlendirildi.¹⁴⁴



Şekil 11: CHEF-DR II sistemi¹⁴⁰

3.7.Multilokus Sekans Tiplendirmesi(MLST)

Karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* izolatlarının Multi lokus sekans tiplendirilmesi Pastör Enstitüsü web sayfasında ve veri tabanlarında (<http://bigsdh.pasteur.fr/klebsiella/>) bulunan protokollere göre filogenetik analizler yapılarak gerçekleştirildi. *gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB* ve *tonB*'yi içeren yedi adet housekeeping gen PCR yardımı ile çoğaltıldı ve DNA dizin analizleri gerçekleştirildi.¹

Tablo 8’de bu genler için primer listeleri verilmiştir. Sekans sonuçlarına göre alel numaraları ve sekans tipleri MLST websitesi kullanılarak belirlendi. Housekeeping genlerin sekans verileri GenBank Veri Tabanında depolandı. Sırasıyla *gapA* geni için OK442461- OK442491, *infB* geni için OK44249-OK442522, *mdh* geni için OK424679- OK424709, *pgi* geni için OK442523- OK442553, *phoE* geni için OK424710- OK424740, *rpoB* geni için OK442554- OK442584 ve *tonB* geni için OK442585- OK442615 arasındaki GenBank Kayıt numaraları alındı.

Primer Adı	Primer Dizisi	Amplikon Büyükluğu (Baz Çifti)	T _m	Kaynak
rpoB	F: Vic3 GGCGAAATGGCWGAGAACCA R: Vic2 GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	501	50 °C	161
gapA	F: 173 TGAAATATGACTCCACTCACGG R :181 C TTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	450	60 °C	161
mdh	F: 130 CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG R: 867 CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	477	50 °C	161
pgi	F:1R GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC R:1F CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT pgi2F(seq): CTGCTGGCGCTGATCGGCAT pgi2R(seq): TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	432	50 °C	161
phoE	F:604.1 ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG R:604.2 TGATCAGAAGTGGTAGGTGAT	420	50 °C	161
infB	1F: CTCGCTGCTGGACTATATTCG 1R: CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC infB2F(seq): ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC	318	50 °C	161
tonB	1F: CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT 2R: ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	414	45 °C	161

Tablo 8: MLST için kullanılan primer dizileri

3.8.MALDI-TOF MS

Bakteri kolonileri EMB besiyerinden koyun kanlı agara (BioMerieux,Fransa) pasajlandı gece boyunca 37°C de etüvde bekletildi. İzolatların tür düzeyinde tanımlanmaları VITEK MS cihazında (versiyon 3.0) analiz edilerek gerçekleştirildi. Bakteri kültüründen birer koloni MALDI-TOF MS slaytı üzerine yayılarak, üzerlerine 1 µl matriks çözeltisi (2,5-dihidroksibenzoik asit ve α-siyano-4-hidroksisinnamik asit) damlatıldı ve kurumaya bırakılarak cihaza yerleştirildi. Elde edilen kütle spektrumları sistemin V3.0 bilgi veri tabanındaki spektrumlarla karşılaştırılarak bakteriler tanımlandı. Sistemin kalibrasyonu ve bakterilerin tanımlanma kontrolü için ATCC *Escherichia coli*

8739 suşu kullanıldı. Tür düzeyinde güven aralığı $\geq 90\%$ olan VITEK MS ile yapılan ilk testin sonucu kullanıldı.

MALDI-TOF VITEK MS üzerinde her bir izolat için elde edilen spektrumlar, örneklerin hiyerarşik kümelenmesinin gerçekleştirilebildiği ve sonuçların bir dendrogram olarak temsil edildiği Saramis yazılım analizi ile birbirleriyle karşılaştırıldı.



4.BULGULAR

Tüm dünyayı etkisi altına COVID-19 pandemisine denk gelmesi nedeniyle çalışmanın örneklem büyüklüğü Aralık 2017 Aralık 2020 zaman aralığında 35 izolatın iki tanesi (12 ve 22 no'lu izolat) MALDI-TOF MS ile tanımlamada *Klebsiella variicola* olarak saptandı, bir tanesi ise (8 no'lu izolat) karbapenem duyarlılığı nedeniyle çalışma dışı bırakıldı. Çalışma 32 adet izolat üzerinden devam etmiştir.

4.1.Antibiyogram Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 32 izolatın 14(%43,7)'ü idrar, 11(%34,3)'i kan ve kateter, 7(%21,8) si solunum yolu örneği idi. İzole edilen 32 suşun 16(%50)'sı yoğun bakım, 10 (%31,2)'u servis ve 6(%18,8)'sı poliklinikten gelmiştir.

Çalışmaya alınan 32 izolatın antibiyogramı VITEK cihazı ile çalışılmış ve sonuçları Tablo 9'da açıklanmıştır.

Antibiyotikler	S (n/%)	I (n/%)	R (n/%)
Amikasin (AK)	12 (37.6)	14 (43.7)	6 (18.7)
Gentamisin (GN)	25 (78.1)	0	7 (21.9)
Tobramisin (TOB)	5 (15.6)	0	27(84.4)
Siprofloksasin (CIP)	2 (6.3)	0	30 (93.7)
Levofloksasin (LEV)	2 (6.3)	0	30 (93.7)
Seftazidim (CAZ)	0	0	32 (100.0)
İmipenem (IPM)	0	7 (21.8)	25 (78.2)
Meropenem (MEM)	0	0	32 (100.0)
Sefepim (FEP)	0	0	32 (100.0)
Piperasillin/tazobaktam (TZP)	0	0	32 (100.0)
Trimetoprim/sülfametoksazol (SXT)	13 (40.6)	0	19 (59.4)
Kolistin (COL)	19 (59.3)	0	13(40.7)
Tigesiklin (TIG)	14 (43.8)	7 (21.9)	11 (34.3)

Tablo 9: İzolatların antibiyogram sonuçları (n=32) S: Duyarlı I: Orta Duyarlı R: Dirençli

4.2.Direnç ve Virölans Genleri Tarama Sonuçları

Çalışmaya alına 32 izolatin PCR ile yapılan tarama sonuçları Tablo 10’da sunulmuştur.

Örnek No	Direnç Geni	Virölans Geni
S1	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S2	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S3	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S4	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S5	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S6	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S7	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , <i>kpn</i> , K2
S9	KPC, SHV	<i>kpn</i>
S10	KPC, SHV	<i>kpn</i>
S11	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i>
S13	OXA-48, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , K2
S14	OXA-48, SHV	<i>magA</i>
S15	NDM, SHV, CTX-M-1, TEM	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S16	KPC, SHV, TEM	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S17	KPC, SHV, TEM	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S18	KPC, SHV, TEM	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S19	KPC, SHV	-
S20	OXA-48, NDM, SHV	-
S21	OXA-48, CTX-M-1	K2
S23	KPC, SHV	<i>kpn</i>
S24	KPC, TEM	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S25	KPC, TEM, SHV	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S26	KPC, TEM, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S27	NDM, CTX-M-1, TEM	<i>kpn</i>
S28	SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S29	NDM, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S30	NDM, SHV	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S31	KPC, TEM, SHV, CTX-M-1	<i>magA</i> , <i>kpn</i>
S32	NDM, SHV, CTX-M-1	<i>kpn</i>
S33	KPC, SHV	<i>kpn</i>
S34	OXA-48	<i>magA</i>
S35	KPC, SHV	<i>kpn</i>

Tablo 10: PCR ile tespit edilen direnç ve virölans genleri

Çalışmaya alınan tüm suşlarda karbapenemazlardan *bla*_{OXA-48} 13(%40,6) izolatta, *bla*_{KPC} 13(%40,6) izolatta, *bla*_{NDM} 6(%18,8) izolatta saptandı. Bir adet suşta hiçbir karbapenemaz geni saptanmadı, bir adet suşta işe 2 adet birden saptandı. Diğer antibiyotik direnç genlerinden *bla*_{SHV} 27(%84,3) izolatta, *bla*_{CTX-M-1} 15(%46,8) izolatta, *bla*_{TEM} 10(%31,2) izolatta saptandı. Diğer direnç genleri saptanmadı. Virölans genlerinden sadece

magA 22(%68,7) izolatta, *kpn* 19(%59,3) izolatta, K2 3(%9,3) izolatta saptandı. Diğer virülans faktörleri tespit edilmedi. String testi ile 19 ve 26 numaralı izolat pozitif saptandı.

4.3.İmmünokromatografik Test Sonuçları

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) biriminden bütçe imkanları dahilinde 12 adet izolat RESIST-4 O.K.N.V ve IMP K-set immünokromatografik test kiti ile çalışıldı. Bu testte pozitif değerlendirdiğimiz karbapenemazlar PCR’da da saptandı.

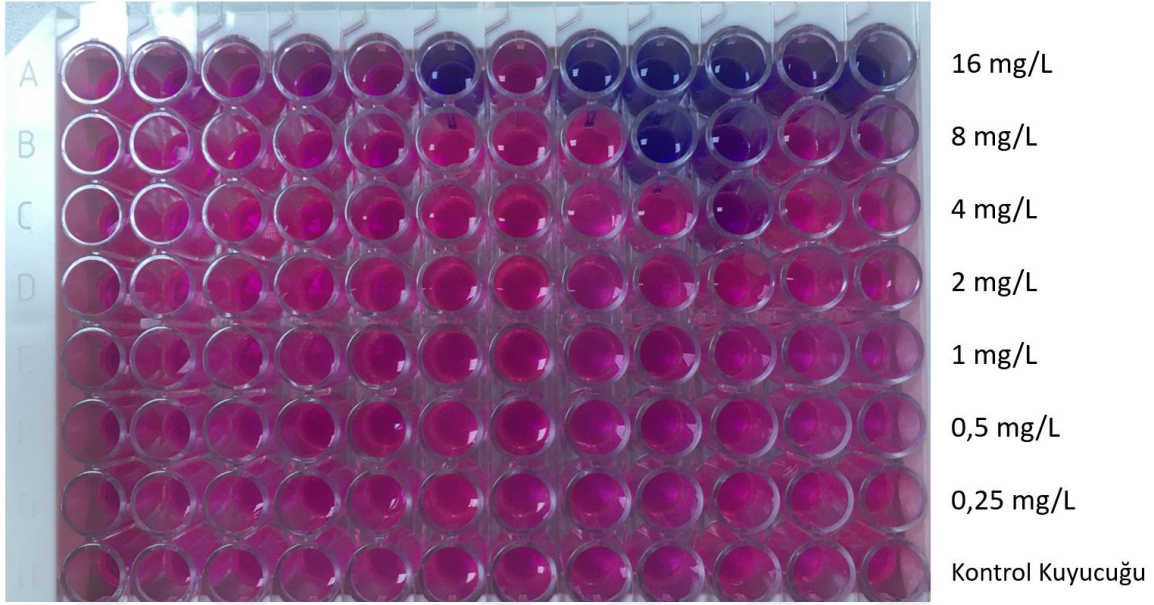


Şekil 12: ICT test sonuçları

Sonuçlar PCR sonuçları ile %100 uyumlu gelmiştir.

4.4.Kolistin Sıvı Mikrodilüsyon Sonuçları

VİTEK-2 (BioMerieux,Fransa) otomatize sistemi ile kolistin dirençli tespit edilen 13 adet suş test edildi. VİTEK ile dirençli bulunan izolatlarla kolistin sıvı mikrodilüsyon sonuçları duyarlılık açısından %100 uyumlu bulundu. Şekil 13’te örnek pleyt gösterilmiştir. Kontrol kuyucuğu H kuyucuğudur. A kuyucuğu 16 mg/L kolistin içerirken G kuyucuğunda 0,25 mg/L kolistin bulunmaktadır. Tablo 11’de MİK değerleri verildi.



Şekil 13: Kolistin sıvı mikrodilüsyon sonuçları

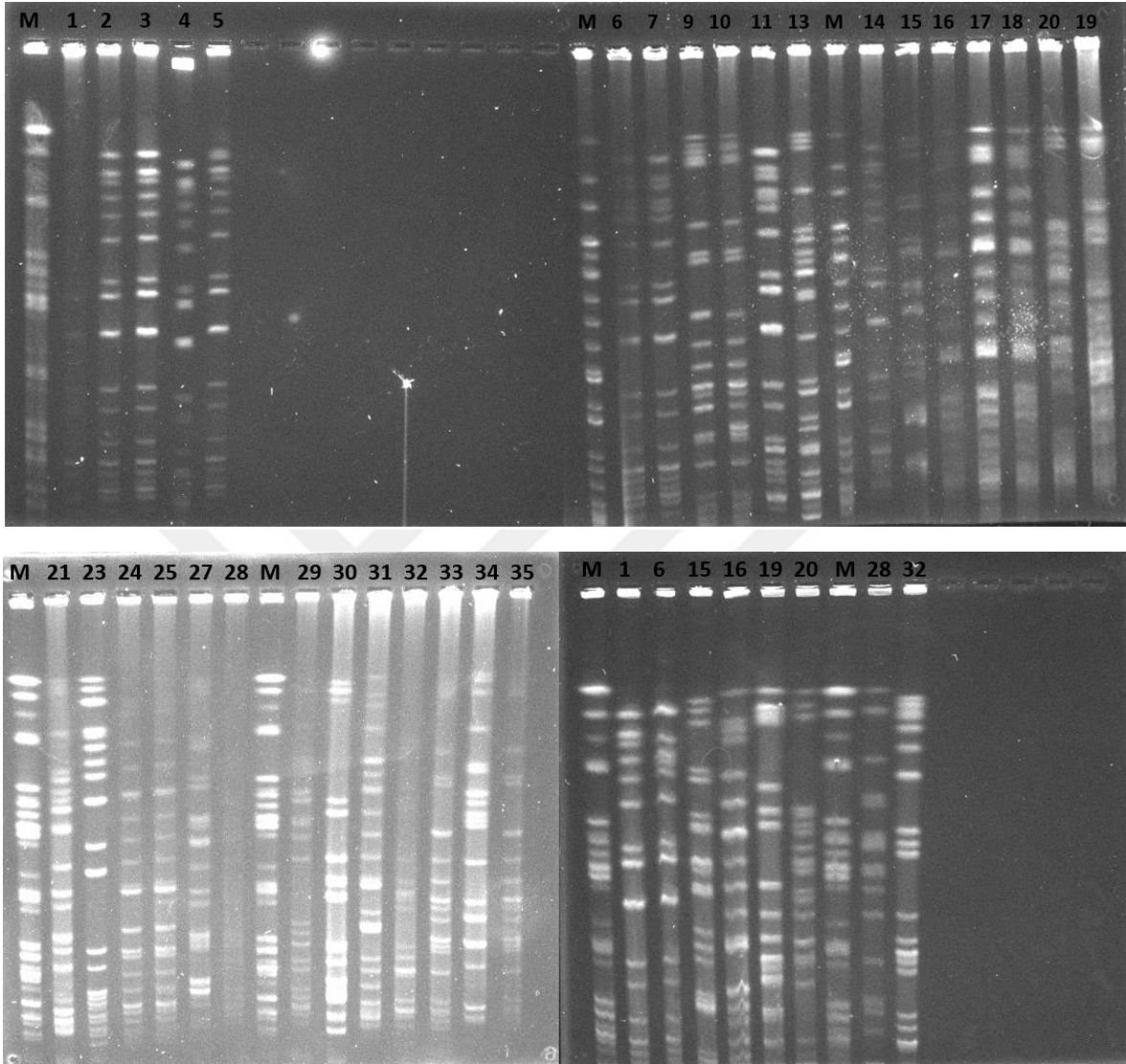
Örnek No	VITEK(MİK, mg/L)	Sıvı Mikrodilüsyon(MİK, mg/L)
S2	≥ 16	>16
S3	≥ 16	>16
S4	≥ 16	>16
S5	≥ 16	>16
S6	4	16
S7	≥ 16	>16
S9	≥ 16	16
S11	≥ 16	>16
S17	8	16
S18	4	8
S19	≥ 16	4
S21	8	16
S35	≥ 16	16

Tablo 11: Kolistin direnç karşılaştırması

4.5.PFGE Sonuçları

Çalışmaya alınan 32 adet suşun bir tanesi (26 no'lu izolat) tekrarlayan çalışmalara rağmen mukoid koloni yapısı nedeniyle bant görüntüleri alınamamasından dolayı çalışmaya alınamadı. Geri kalan 31 adet örneğin UV ışık altında görüntülenen DNA band

profil görüntüleri göz ile değerlendirildi. Jel görüntüleri Şekil 14'te gösterilmiştir. Değerlendirmede marker olarak *K. pneumoniae* ATCC 13883 kullanıldı.



Şekil 14: PFGE jel görüntüleri (M: Marker)

Değerlendirmeye alınan 31 izolatın Tenover kriterlerine göre göz ile değerlendirilmesinde 7 farklı küme bulundu. DNA bant profilleri incelenerek yapılan analize göre 1,2,3,4,5,6,7 numaralı izolatlar birbirleriyle aynı, 14 numaralı izolat bunlarla muhtemel ilişkili; 9 ve 10 no'lu izoaltlar birbirleriyle yakın ilişkili, 13 ve 21 numaralı izolatlar muhtemel ilişkili; 16,17,18 no'lu izolatlar aynı; 24 ve 25 no'lu izolatlar aynı; 33 ve 35 no'lu izolatlar aynı bulundu. Tablo 12,13 ve 14'te PFGE analizi ile sınıflandırılan izolatlar, Tablo 15'te ilişkisiz izolatlar MLST sonucu belirlenen ST tipleri, numunenin alındığı servis ve numune türleri belirtildi.

Numune No	ST	Servis	Numune Türü
1	ST101	Cerrahi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat
2	ST101	Cerrahi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat
3	ST101	Cerrahi Yoğun Bakım	Kateter
4	ST101	1. Basamak Cerrahi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat
5	ST101	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan (Kateter)
6	ST101	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan
7	ST101	Dahiliye Servis	Kan
14 (<i>Muhtemel İlişkili</i>)	ST101	Üroloji Poliklinik	İdrar
16	ST16	1. Basamak Cerrahi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat
17	ST16	1. Basamak Cerrahi Yoğun Bakım	Kan
18	ST16	1. Basamak Cerrahi Yoğun Bakım	Trakeal Aspirat
24	ST16	1. Basamak Cerrahi Yoğun Bakım	Kan
25	ST16	Anestezi ve Reanimasyon Yoğun Bakım	Kan
33	ST307	Üroloji Servisi	İdrar
35	ST307	Cerrahi Yoğun Bakım	İdrar

Tablo 12: PFGE ile aynı olarak tespit edilen izolatlar

Numune No	ST	Servis	Numune Türü
9	ST307	Dahiliye Servis	Kan
10	ST307	Dahiliye Yoğun Bakım	Kan

Tablo 13: Yakın ilişkili izolatlar

Numune No	ST	Servis	Numune Türü
13	ST14	Cerrahi Yoğun Bakım	İdrar
21	ST14	Cerrahi Yoğun Bakım	Kan

Tablo 14: Muhtemel ilişkili izolatlar

Numune No	ST	Servis	Numune Türü
11	ST101	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Servisi	İdrar
15	ST147	Hematoloji Servis	Kan
19	ST307	Enfeksiyon Poliklinik	İdrar
20	ST377	Dahiliye Servis	Kan
23	-	Enfeksiyon Servis	İdrar
27	ST147	Dahiliye Servis	İdrar
28	ST14	Üroloji Poliklinik	İdrar
29	ST14	Enfeksiyon Poliklinik	İdrar
30	ST309	Pediatric Poliklinik	İdrar
31	ST309	Kulak Burun Boğaz Servisi	Balgam
32	ST395	Nöroloji Servisi	İdrar
34	ST2096	Üroloji Poliklinik	İdrar

Tablo 15: Birbirleriyle ve diğer suşlarla ilişkisiz izolatlar

4.6. MLST Sonuçları

Yapılan MLST analizleri sonucunda çalışmaya alınan 32 adet suş çalışmaya alındı. Bir adet suş (23 no'lu izolat) analiz sonucu *K. quasipneumoniae* olarak tanımlandı ve değerlendirmeye alınamadı. Geriye kalan 31 adet izolatın ST tipleri belirlendi. Sonuçlar Tablo 16'da gösterilmektedir. MLST analizlerinde ST101 tipi %29 oranında en yaygın ST tipi olarak belirlendi. ST101'i sırasıyla ST16, ST307, ST14, ST147, ST309, ST377, ST395 ve ST2096 tipleri takip etmektedir. ST oranları Tablo 17'de gösterilmiştir.

	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>	STs
S1	2	6	1	5	4	1	6	101
S2	2	6	1	5	4	1	6	101
S3	2	6	1	5	4	1	6	101
S4	2	6	1	5	4	1	6	101
S5	2	6	1	5	4	1	6	101
S6	2	6	1	5	4	1	6	101
S7	2	6	1	5	4	1	6	101
S9	4	1	2	52	1	1	7	307
S10	4	1	2	52	1	1	7	307
S11	2	6	1	5	4	1	6	101
S13	1	6	1	1	1	1	1	14
S14	2	6	1	5	4	1	6	101
S15	3	4	6	1	7	4	38	147
S16	2	1	2	1	4	4	4	16
S17	2	1	2	1	4	4	4	16
S18	2	1	2	1	4	4	4	16
S19	4	1	2	52	1	1	7	307
S20	10	20	2	1	1	11	12	377
S21	1	6	1	1	1	1	1	14
S24	2	1	2	1	4	4	4	16
S25	2	1	2	1	4	4	4	16
S26	2	1	2	1	4	4	4	16
S27	3	4	6	1	7	4	38	147
S28	1	6	1	1	1	1	1	14
S29	1	6	1	1	1	1	1	14
S30	2	9	2	1	13	1	10	309
S31	2	9	2	1	13	1	10	309
S32	3	1	2	4	1	1	4	395
S33	4	1	2	52	1	1	7	307
S34	1	6	1	1	1	46	1	2096
S35	4	1	2	52	1	1	7	307

Tablo 16: *K. pneumoniae* izolatlarının MLST analizleri sonucunda belirlenen ST tipleri

ST	ST101	ST16	ST307	ST14	ST147	ST309	ST377	ST395	ST2096
n(%)	9 (29)	6(19.4)	5(16.1)	4(12,9)	2(6.5)	2(6.5)	1(3,2)	1(3,2)	1(3,2)

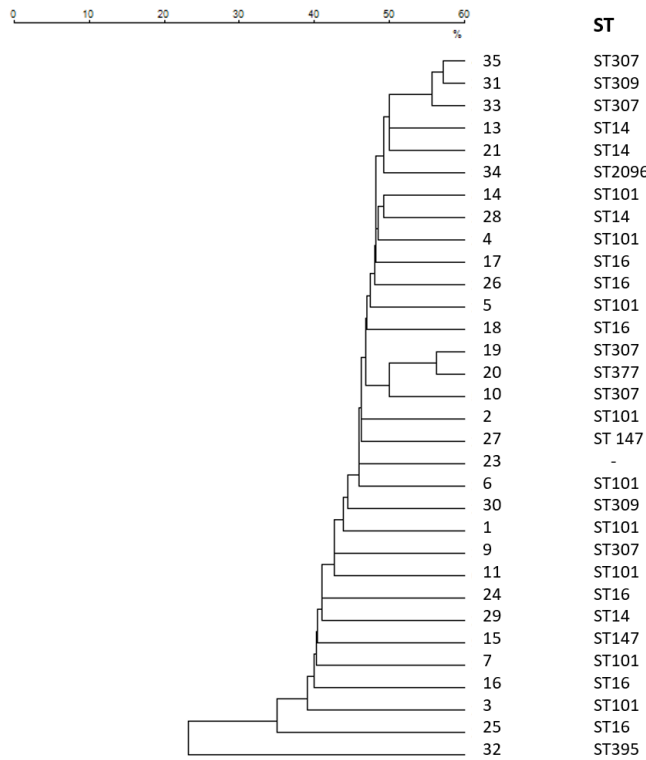
Tablo 17: İzolatların ST tipleri dağılımı

VITEK-2 ve MALDI-TOF MS ile MLST arasındaki bakteriyel tanımlamadaki uyum oranı %96,8 olarak saptandı.

4.7.MALDI-TOF MS Sonuçları

Hizmet alımı şeklinde dış merkezde yapılan analiz sonucu izolat tanımlama sonuçları ve kütle spektrumlarına bağlı oluşturulan dendrogram analizi tarafımıza gönderilmiştir. Konvansiyonel yöntemler ve VITEK-2 otomatize sistem ile *K. pneumoniae* olarak tanımlanan izolatlardan 12 ve 22 numaralı izolatlar MALTIDOF ile tanımlama sonucu *K. variicola* olarak tanımlandı ve çalışmadan çıkarıldı. Bunun sonucunda VITEK-2 tanımlama ile MALDI-TOF arasındaki bakteriyel tanımlamadaki uyum %94,3 olarak bulundu.

Bu durumda 32 izolat MALDI-TOF sisteminde işleme alınmıştır. Kütle spektrumlarına bağlı oluşturulan dendrogram analizi şekil 15'te verilmiştir.



Şekil 15: MALDI-TOF MS dendrogram analizi

Değerlendirme sonucu suşlar arasındaki maksimum benzerlik %70'i geçmedi. Dendrogramda homojen dağılım var. Gruplaşma bulunmamaktadır. Karbapenem direnci piklerinde değişiklik ve farklılıklar oluşturmadi. Bu durum; KPC, IMP, VIM, NDM, OXA gibi çeşitli genler rol oynamasından kaynaklanmaktadır.



5.TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç; bakteriler, virüsler, mantarlar ve parazitler gibi enfeksiyöz ajanlarda ve özellikle ilaçların uygunsuz kullanımı ile artmakta ve küresel bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır. Özellikle çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae*'nin neden olduğu hastane salgınlarının, sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle yüksek morbidite ve mortalite ile sonuçlandığı yaygın olarak bilinmektedir.^{162,163}

K. pneumoniae izolatlarında antibiyotiklere gittikçe artan direncin gösterildiği çalışmalar artmaktadır. Çin'de yapılan 2013-2018 yılları arasında 4128 *K. pneumoniae* izolatı ile yapılan bir çalışmada totalde TZP %27,8, IMP %24,2, CAZ %40,5 AK %18,8 GN %37, TOB %24,8, CIP %38,2, LEV %32,4 FEP %35,8 SXT %35,7 ve TIG'e %6,1 oranında direnç tespit edilmiş ve bu oranlar yıldan yıla artış eğilimi göstermiştir.¹⁶⁴ Ülkemizde 28 hastanenin katıldığı bir çalışmada ise *K. pneumoniae* izolatlarında direnç oranları AK %33,6 , FEP %72,7 , CAZ %75,1 , CIP %65,6 , COL %28,4, GN %42,6 IMP %48,6 MEM %51,9 , TZP %62,8 , TOB %59,6 , SXT %72,1 olarak tespit edilmiştir.¹⁶⁵ Ünlü ve arkadaşlarının ülkemizde yaptığı çalışmada 2017 yılında toplanan 177 adet *K. pneumoniae* izolatında karbapenem direnç oranının %12,4 oranında görüldüğü saptanmıştır. Bu dirençli suşlarda AK %50 GN %31,2 TIG 27,3 SXT %86,3 CIP 72,7 CAZ %100 dirençli saptanırken, COL direncine rastlanmamıştır.¹⁶⁶

Miao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada dört yıllık sürede izole edilen 42 KdKp izolatında direnç oranları IMP, MEM %100 CAZ, TZP %97,6 FEP %94,2 GN %88,1 AK %64,3, CIP %90,5, LEV %83,3 SXT %45,2, TIG %9,5, COL %4,8 şeklinde saptanmıştır.¹⁶⁷

Çalışmamızdaki 32 izolatın antibiyotik duyarlılık sonuçları değerlendirildiğinde, hepsi TZP, CAZ, FEP ve MEM'e, %93,7'si LEV ve CIP'e, %84'ü TOB'e, %21'i CN'ne, %59,3'ü SXT'e, %34,3'ü TIG'ne, %18,7'si AK'ne ve %40,6'sı COL'ne dirençli bulunmuştur. Gram negatiflerde karbapenem direnci genellikle aminoglikozid, kinolon direnciyle beraber görülmektedir.¹⁶⁸ Fakat bizim çalışmamızda aminoglikozid karşı direnç düşük saptanmıştır. Bu durumun hastanemizde aminoglikozid kullanımının fazla tercih edilmemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. KÜE izolatlarında toksisite endişesiyle geçmişte nadiren uygulanan polimiksinler yeniden kullanıma girmiş ve görece olarak yeni keşfedilen tigesiklin ile birlikte son çare seçenekleri haline gelmiştir.¹⁶⁸ Fakat bu ilaçların

son yıllarda yaygın kullanımı sonrası direnç gelişimi artmıştır.¹⁶⁹ Çalışmamızda görülen direnç oranları da bunu desteklemektedir.

Kolistin direncinin saptanmasında çeşitli yöntemler disk difüzyon, E-test, otomatize sistemler, agar dilüsyon ve sıvı mikrodilüsyon gibi yöntemler kullanılmaktadır. EUCAST kolistin direncini ölçmede sıvı mikrodilüsyon yöntemini önermektedir. Fakat yapılan bazı çalışmalarda VITEK-2 sisteminin de kolistin direncini saptamada güvenilir bir yöntem olduğu vurgulanmıştır.^{149,170} Bizim çalışmamızda VITEK 2 ile dirençli saptanan bütün suşlar sıvı mikrodilüsyonla dirençli saptanmıştır. Ancak MİK değerleri arasında farklılıklar bulunmaktadır.

K. pneumoniae izolatlarında hangi direnç genlerinin dirence neden olduğuna dair moleküler çalışmalar gittikçe önem kazanmaktadır. Literatüre bakıldığında başlıca *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} direnç genleri ile ilgili olarak pek çok çalışma yapıldığı görülmektedir.^{152,167,171,172,173}

İlk olarak ülkemizde 2001 yılında sporadik olarak tespit edilen OXA-48 enzimi, daha sonraları çeşitli salgınlara yol açmıştır ve ülkemiz için endemik hale gelmiştir.^{158,174} Yapılan çalışmalar ülkemizde hala en yaygın karbapenemazın OXA-48 olduğunu göstermektedir.^{103,165} Türkiye dışında gerçekleşen ve Türkiye ile belirgin bir bağlantısı olmayan ilk OXA-48 pozitif *K. pneumoniae* vakası 2007 yılında Belçika'da lenfoma tedavisi gören bir hastada tespit edilmiştir.¹⁷⁵ Artık Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde endemik olarak bulunmakta ve nazokomiyal salgınlara neden olmaktadır.⁶⁶ Ülkemizde yapılan çalışmalarda KdKp izolatında sırasıyla %68,8 ve %82,45 oranında OXA-48 saptanmıştır.^{171,172} Bizim çalışmamızda ise bu oran ilginç olarak %40,6 ya kadar gerilemiş ve KPC ile aynı oranda saptanmıştır.

KPC 1990'lı yıllarda tanımlanmasına ve dünya genelinde çeşitli salgınlara neden olduğu bilinmesine rağmen 2014 yılına kadar Türkiye'de rapor edilmemiştir.¹¹⁶ EuSCAPE verilerine göre Avrupa'da en sık saptanan karbapenemaz KPC'dir ve 2013-2014 yılları arasında yapılan bu çalışmada ülkemizden alınan örneklerde KPC bulunamamıştır.¹⁰⁸

NDM üreten bakteriler Birleşik Krallık, Hindistan ve Pakistan'da daha yaygındır ve ilk kez 2012 yılında İstanbul'da allojenik hematopoietik kök hücre nakli için hastaneye yatırılan lösemili İranlı bir hastada bildirilmiştir.¹¹² Bizim çalışmamızda suşların %18,8

oranında NDM saptanmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada *KdKp* izolatlarında NDM oranının %52,9 a kadar çıktığı gösterilmiştir.¹⁷⁶

K. pneumoniae da IMP üretimi ağırlıklı olarak Çin, Japonya ve Avustralya'da tanımlanırken, VIM içeren izolatlar ağırlıklı olarak İtalya ve Yunanistan'da bulunur.¹⁷⁷ Çalışmamızda incelenen karbapenemazlardan VIM ve IMP saptanamamıştır. Az da olsa ülkemizde VIM ve IMP pozitifliği gösteren çalışmalar bulunmaktadır.^{178,179}

Çalışmamızda karbapenemaz birlikteliği sadece bir suşta OXA-48+NDM şeklinde saptanmıştır. Çakar ve arkadaşlarının ülkemizde yaptığı çalışmada OXA-48 ve NDM birlikteliği %2.4 oranında gözlenmiştir.¹⁸⁰ Ülkemizde yapılan başka çalışmada ise *KdKp* izolatlarında KPC + OXA-48 birlikteliği %18 oranında gösterilmiştir.¹⁶⁶ Genç ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada %1 oranında KPC + OXA-48 birlikteliği, %2 oranında KPC+NDM birlikteliği gösterilmiştir.¹⁷⁹

Ayrıca, incelenen karbapenemaz direnç genlerinden hiçbirinin tesbit edilmediği bir adet izolatta karbapenem MİK değeri dirençli sınırın üzerinde saptanmıştır. Bu da bize karbapenem direnç mekanizmalarının sadece bu çalışmadaki beş karbapenemaz enzimine bağlı olmadığı, farklı enzim veya mekanizmaların da rol alabileceğini göstermiştir. Ye ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada *KdKp* izolatlarında *OmpK35* ve *OmpK36* ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir.¹⁸¹

GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da 1980'lerde ortaya çıktı ve o dönem de baskın olan tip TEM ve SHV idi. Günümüzde ise daha çok CTX-M tipi GSBL'ler baskın olarak bulunmaktadır.¹⁸² Ülkemizde *KdKp* suşlarında yapılan çalışmada GSBL genleri olan TEM, SHV ve CTX-M-1 sırasıyla %86,36, %86,36, %95,45 gibi yüksek oranlarda tespit edilmiştir. Ayrıca, bu genler tüm suşların %77,3'ünde beraber bulunmuştur.¹⁶⁶ Erdem ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 50 adet *KdKp* suşunda suşların %60'ında TEM, %78'inde SHV, %48'inde CTX-M-1 ve %10'unda CTX-M-2 saptanmıştır. TEM, SHV ve CTX-M-1 suşların %32'sinde beraber bulunmuştur.¹⁸³ Bizim çalışmamızda ise en çok saptanan %84,37 ile SHV olurken, CTX-M-1 %46,9 oranında, TEM ise %31,2 oranında saptandı. Sadece suşların %12,5'inde bu üç gen ortak olarak bulundu.

Kapsül, lipopolisakkaritler, sideroforlar ve fimbriyalar *K. pneumoniae*'nın temel virülans faktörlerini oluşturur.² cKP ile karşılaştırıldığında, hvKP çoğunluğu, kapsül üretimini ve siderofor alımını artıran virülans genleri taşıyan 200-220 kb pLVPK benzeri

bir virölans plazmiti barındırır. Hipermukoviskozite, *rmpA* geni tarafından kodlanan hvKP'nin özelliklerinden biridir. Ayrıca sideroforlar salmochelin (*iroBCDE* ve *iroN*) ve aerobaktin (*iucABCD* ve *iutA*) tipik olarak hvKP tarafından üretilir. Bu nedenle bu genler, primerler ile PCR kullanılarak virölans plazmidi pLVPK'nin bir göstergesi olarak kullanılabilir.¹⁸⁴

magA geni, *K.pneumoniae*'da kapsül sentezinde göre alır ve fagositoza karşı dirençte önemli rol oynar ve K1 serotipi ile ilişkilidir.¹⁸⁵ Kuş ve arkadaşlarının Türkiye'de bir üniversite hastanesinde yaptığı çalışmada 2011-2013 yılları arası toplanan 53 adet *K. pneumoniae* suşunda %49,1 *kpn* saptanırken *magA*'ya hiç rastlanmamıştır.¹⁸⁶ Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada ise yine benzer şekilde *magA*'ya rastlanmazken %50 oranında *kpn* saptanmıştır.³⁵ Bu çalışmadaki suşların %68'inde *magA* saptandı.

Klasik *K pneumoniae* suşları tarafından da üretilse de, en yaygın hvKp kapsül tipleri K1, K2, K5, K20, K54 ve K57'dir ve bunların büyük çoğunluğunu K1 ve K2 oluşturur.³³ Bizim çalışmamızda bu kapsül tiplerinin hepsine bakılmış fakat sadece %9 oranında K2 saptanmıştır. Uganda'da yapılan bir çalışmada KdKp izolatlarında kapsül tipleri incelenmiş ve K1, K2, K5, K20 sırasıyla %2,2, %3,1, %18,5, %15,4 oranında bulunmuştur, K54 ve K57 ye rastlanmamıştır.¹⁸⁷ hvKp suşlarda özellikle karbapenemlere karşı gelişen direnç gelişimi sağlık sistemi açısından büyük tehdit oluşturmaktadır.³²

String testi sonucu saptanan iki izolattan birinde hiçbir virölans geni saptanmazken, diğerinde *magA* ve *kpn* pozitifliği görüldü.

Karbapenemazların hızlı ve kolay tanımlanması için farelerden elde edilen monoklonal antikorlara dayalı yan akımlı immünokromatografik testlerle yapılan çalışmalara baktığımızda; 2018 yılında Sağiroğlu ve arkadaşlarının RESIST-3 O.K.N. K-SeT kiti ile KdKp suşlarında yapılan çalışmada 102 izolatta OXA-48, NDM ve KPC üretimine bakılmıştır. PCR sonuçları ile karşılaştırıldığında duyarlılığın %100 olduğu bulunmuştur.¹⁷⁶ Yine aynı yılda Fransa'da yapılan bir çalışmada KÜE izolatlarında RESIST-4 O.K.N.V K-SeT kiti ile; KPC ve OXA-48 üretimi %100 saptanırken, VIM %75, NDM ise sadece %28 oranında tespit edilmiştir.¹⁸⁸ Song ve arkadaşlarının KÜE suşları ile yaptığı çalışmada RESIST-4 O.K.N.V K-SeT ile hedeflenen dört karbapenemazdan sadece birini üreten 30 izolatın hepsini doğru bir şekilde tanımlanmış. Ayrıca, KPC ve NDM, VIM ve NDM veya OXA-48 benzeri ve NDM'yi birlikte üreten 15 izolatı doğru bir şekilde

tanımlanmış. Ancak NDM-1 ve OXA-232'yi birlikte üreten *K.pneumoniae* izolatlarını saptayamamıştır. Karbapenemaz üretmeyen 16 karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* ve dört KÜE izolatının tümü negatif sonuçlar sergiledi ve hiçbir çapraz reaksiyon gözlenmemiştir.⁹⁴ Bu çalışmada ise ayrılan bütçe ile baktığımız 12 adet izolatın RESIST-4 O.K.N.V ve IMP K-set immünokromatografik test sonuçları, PCR sonuçları ile %100 uyumlu bulundu. PCR ile karbapenemaz geni saptanamayan suşta da herhangi bir pozitiflik saptanmadı.

İzolatlar arasındaki epidemiyolojik ilişki ile mükemmel hatta altın standart kabul edilen PFGE ile klonal ilişki araştırılan ve ülkemizde yapılan bir araştırmada 2015-2017 yılları arasında izole edilen 84 adet KdKp suşu PFGE ile tiplendirilmiş. 24 tip tespit edilmiş ve izolatların %63,09'unun dört ana pulstip içinde bulunduğu gösterilmiştir.¹⁷⁹ Yine ülkemizde yapılan başka bir çalışmada 93 karbapenem ve kolistine dirençli *K. pneumoniae* izolatının tümü, üç küme ve beş pulstip olarak gruplandırılmıştır. Üçüncü küme, 71 izolat içeren en büyük küme olurken, birinci kümede 14 izolat, ikinci kümede 8 izolat saptanmıştır. PFGE'nin ayırım gücü Simpson'ın çeşitlilik indeksi analizine göre %96 olarak hesaplanmıştır.¹⁸⁹ PFGE yönteminin klonal izolatları tiplendirme ve salgın kaynağını belirleme gücü kısa süreli salgınlarda yüksek iken, uzun süreli salgınlarda bu özelliğinin azaldığı gösterilmiştir.¹⁹⁰ Restriksiyon kısıtlama enzimleri ile genom çapında DNA parmak izleri oluşturan PFGE, aynı zamanda uygun maliyetli bir yöntemdir; bununla birlikte, yoğun emek gerektirir ve özellikle PFGE jel görüntü analizinde bantları tanımlamadaki kullanıcı hataları nedeniyle laboratuvarlar arasında karşılaştırmalarda sıkıntılar yaşanabilir.¹⁹¹ Sakai ve ark. yaptığı bir çalışmada bir yoğun bakım ünitesinde karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* salgını sırasındaki horizontal bulaşı değerlendirmek için PFGE ile moleküler analiz yapılmış olup bu suşların bir kısmı için PFGE'ye ek olarak analiz için MLST kullanılmış ve sonuçların birbirleriyle uyumlu olduğu bulunmuştur.¹⁹²

Bu çalışmada 14 izolatın birbirleriyle aynı/benzer ilişkili olduğu ve kendi içinde 4 farklı kümelenme yaptığı; yakın ilişkili 2 izolatın bir kümelenme oluşturduğu; muhtemel ilişkili olarak değerlendirilen 10 izolatın iki farklı küme oluşturduğu gösterildi. Bu veriler, hastane içinde yayılma potansiyelleri açısından karbapenem direnç genleri için sürekli uyanık olunması gerektiğini bir kez daha gösterdi.

Belirli lokuslardaki nükleotid dizilimlerini inceleyerek allel oluşturma prensibine dayanan, nükleotid dizilimi bir lokustaki tüm varyasyonu ortaya çıkardığı için, lokus başı atanan alel sayısı da yüksek olduğu için izolatlar arasındaki ilişkiler, alelik profillerin karşılaştırılmasıyla yapılabilen MLST yöntemi yine son yıllarda gittikçe artan oranda kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin ülkemizde Hızırolan ve arkadaşları tarafından karbapenem ve kolistin dirençli 93 adet *K. pneumoniae* suşunda yapılan bir çalışmada MLST analizinde en çok saptanan klon ST101 olarak belirlenmiştir.¹⁸⁹ *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan başka bir çalışmada ST14 ve ST2096 baskın tip olarak görülürken suşların neredeyse tamamında OXA-48 pozitifliği saptanmıştır.¹⁹³ Bizim çalışmamızda da %29'luk oranla en çok ST101 saptanmıştır. ST101 klonu karbapenemazların yayılmasından sorumlu olan ve OXA-48 genini bulunduran IncL plazmidini taşımaktadır.¹⁹⁴ Çalışmamızda saptanan tüm ST101 klonları bu çalışmayla paralel olarak OXA-48 geni taşımaktadır.

Dünya genelinde KPC üreten klon, *K. pneumoniae* ST258'dir.¹⁹⁵ ST11 ise ST258'in tek lokus varyantıdır ve özellikle KPC-2 ve KPC-3 alt tipleri son 20 yılda KPC'nin küresel yayılımında rol oynamıştır ve aynı klonal komplekse aittir.¹⁹⁶ Bizim çalışmamızda ise KPC içeren suşların büyük oranda ST16 ve ST307 klonuna ait olduğu saptandı. Çeşitli çalışmalarda ST16 klonu daha çok OXA-48 ve NDM ile ilişki gösterirken, KPC ile nadiren ilişkili gösterilmiştir.^{163,197} Ayrıca ülkemizde *K. pneumoniae*'lardaki KPC oranı genelde düşük oranlarda saptanmış veya hiç gösterilmemiştir.^{172,176,179,189} Fakat bu çalışmada yüksek oranda (%40,6) KPC saptandı.

Yunanistan'da yapılan çalışmada 2013-2016 yılları arasında izole edilen 480 karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* izolatının %71'inin NDM üreten suş olduğu, bu suşlarda baskın klonun ST11 olduğu saptanmış, kalan dört ST klonal tip (ST15, ST70, ST258 ve ST1883) sporadik olarak tespit edilmiştir.¹¹³ Mevcut çalışmada tespit edilen 6 NDM üreten izolatın ikisi ST147 ikisi ST14 diğerleri ise ST377, ST395 olarak tanımlandı.

Son yıllarda ülkemizde de bazı hastanelerde rutin hizmet laboratuvarlarında kullanılmaya başlanan ve proteinlerin kütle spektrumlarının ölçülmesi esasına dayanan MALDI-TOF MS ile yapılan tiplendirme çalışmaları artmıştır. Çin'de yapılan bir çalışmada 71 adet karbapenem dirençli *K.pneumoniae* MALDI-TOF MS ve MLST yöntemleri birlikte kullanılmış. ST11 izolatlarının neredeyse tamamı KPC-2 üreten

K.pneumoniae idi. Neredeyse tüm ST11 izolatları, tüm MADI-TOF MS tiplerinin yarısını kapsayan MS tiplerinde kümelenme göstermiştir.¹

İtalya’da yapılan bir çalışmada PFGE ve MLST'nin ayırt edici özellikleri, benzersiz ST'lerin sayısı ve tanımlanan kümelerin sayısı ile karşılaştırıldığında PFGE’nin daha iyi bir ayırım gücü olduğu gösterilmiştir.¹⁹¹

Geleneksel tiplendirme yöntemlerinden MLST ve PFGE hem çok yoğun emek gerektirirken hem de çok pahalı tekniklerdir. Fakat MALDI-TOF MS numune analizi başına düşük bir maliyet ve hızlı sonuçlar sağlar. MALDI-TOF MS tiplendirmesi daha çok korunmuş olan intrinsek proteinlerin ekspresyonuna dayanmaktadır, bu da suşları evrimsel açıdan sınıflandırmada kısıtlama oluşturmaktadır. Ayrıca ayrıntılı bir istatistiksel analiz yapılmasını gerektirir.¹⁹⁸ Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 44 adet KdKp suşu tiplendirilmiştir. MLST ve PFGE sonuçları arasında uyum bulunurken MALDI-TOF MS ile tiplendirmenin diğer iki yöntemle uyuşmadığı tespit edilmiştir.¹²

Epidemiyolojik araştırmalardaki MLST analizlerinin amacı filogenetik ilişkileri hesaplamak değildir. Fakat MLST, sekans tiplerinin ilişkisini ve ortaya çıkışını göstermek için “alelik profillere” dayalı kümelemeyi kullanır. Alelik profilleri destekleyen sekans bilgileri, filogenetik hesaplamalar için kullanılabilir ve bu nedenle, prokaryotik türlerin filogenetik ilişkilerinin daha derinlemesine bir görünüm sağladığı için bakteri tanımlama ve sınıflandırma için kullanılabilir.¹⁹⁹

Daha önceleri *K. pneumoniae*’nın alt tipleri olan *K. quasipneumoniae* ve *K. variicola* artık farklı türler olarak değerlendirilmektedir. Ancak, yakın fenotipik ve biyokimyasal özellikleri nedeniyle bu türler arasında konvensiyonel tanı yöntemleri kullanılarak ayırım yapmak zordur. Ayrıca bu bakterilerin MALDI-TOF MS ile analizinde oluşturulan kütle spektrumları, *K. pneumoniae*’nin spektrumuna çok benzemektedir. Bu nedenle, tanımlamada yanlışlıklar yapılmaktadır.¹⁶ Nitekim bu çalışmada da VITEK-2 ile *K. pneumoniae* saptanan iki izolat MALDI-TOF MS ile *K. variicola* olarak tanımlandı. Ayrıca VITEK-2 ve MALDI-TOF MS ile *K. pneumoniae* olarak saptanan başka bir suş ise MLST ile yapılan analizde *K. quasipneumoniae* olarak saptandı.

6.SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmada izolat sayısının az olması dezavantaj olmuştur. Daha çok örnek içeren çalışmalar yapılmalıdır.

BAP bütçesine göre hareket edildi. PCR ile karşılaştırma yapmak amacıyla sadece 12 izolatta çalışıldı ve ICT sonuçları PCR sonuçları ile %100 uyumlu bulundu. Test edildiği kadarıyla duyarlılığı yüksek bulunan ICT testleri, maliyet etkinlikleri değerlendirilerek laboratuvarlarda hızlı sonuç vermeleri ve pratik olmaları nedeniyle kullanılabilir.

Kolistin direncinin saptanmasında otomatize sistemlerin faydalı olduğu gösterilse de standart yöntem olan sıvı mikrodilüsyon kullanılmalıdır.

Direnç genlerinden en sık SHV(%84,3) sonra sırayla CTX-M-1(%46,8), OXA-48(%40,6), KPC(%40,6), TEM(%31,2), NDM(%18,8) saptandı. Taranan genlerden VIM, IMP, CTX-M-2, GES, PER pozitifliğine hiç rastlanmadı. Ülkemizde düşük oranda görülen KPC, bizim çalışmamızda OXA-48 ile aynı oranda saptandı.

Virülans genlerinden en sık *magA*(%68,7) sonra sırayla *kpn*(%59,3) ve K2(%9,3) tespit edildi. Taranan genlerden *rmpA*, *allS*, *iutA*, *iucA*, K1, K25, K20, K54, K57 pozitifliğine hiç rastlanmadı. Ülkemizde virülans genleri ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Moleküler tiplendirmede MLST ile PFGE sonuçlarının uyumlu olduğu gösterildi. Fakat MALDI-TOF MS bu yöntemler ile uyumlu bulunmadı ve ayırım gücü düşük olarak gösterildi.

MLST analizi ile saptanan aynı ST klonlarının, altın standart yöntem olan PFGE ile analizde klonal açıdan ilişkisiz olabileceği gösterildi.

PFGE ile yapılan analizde izolatların 19'unun Tenover kriterlerine göre 6 farklı küme içinde kümelendiği gösterildi, diğer izolatlar ise birbirleriyle ilişkisiz olarak saptandı. PFGE DNA bant paternlerinin klonal ilişki açısından biyoinformatik yöntemlerle dendrogram analizinin yapılması daha uygun olacaktır.

VITEK-2 otomatize sistem, MALDI-TOF MS, MLST ile yapılan bakteriyel tanımlamalar arasında farklılıklar bulunmaktadır.

Karbapeneme dirençli bakterilerin enfeksiyon kontrolü açısından her kurum tarafından takip edilmesi, hem tüm dünyada global bir halk sağlığı sorunu haline gelen antibiyotik direnci ile mücadele için akılcı antibiyotik kullanım politikalarına hem de enfeksiyon kontrol önlemlerine katkı sağlayacaktır.



7. KAYNAKÇA

1. Meng X, Yang J, Duan J, et al. Assessing Molecular Epidemiology of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-KP) with MLST and MALDI-TOF in Central China. *Sci Reports* 2019 91. 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-018-38295-8
2. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(3):629-661. doi:10.1128/mmbr.00078-15
3. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(27):E3574-E3581. doi:10.1073/pnas.1501049112
4. Zhao Y, Zhang X, Torres VVL, et al. An Outbreak of Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in an Intensive Care Unit of a Major Teaching Hospital in Wenzhou, China. *Front Public Heal.* 2019;7(August):1-11. doi:10.3389/fpubh.2019.00229
5. Ferreira RL, Da Silva BCM, Rezende GS, et al. High prevalence of multidrug-resistant *klebsiella pneumoniae* harboring several virulence and β -lactamase encoding genes in a brazilian intensive care unit. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN). doi:10.3389/fmicb.2018.03198
6. Ur Rahman S, Ali T, Ali I, Khan NA, Han B, Gao J. The Growing Genetic and Functional Diversity of Extended Spectrum Beta-Lactamases. *Biomed Res Int.* 2018;2018. doi:10.1155/2018/9519718
7. Tamma PD, Han JH, Rock C, et al. Carbapenem therapy is associated with improved survival compared with piperacillin-tazobactam for patients with extended-spectrum β -lactamase bacteremia. *Clin Infect Dis.* 2015;60(9):1319-1325. doi:10.1093/cid/civ003
8. Lomonaco S, Crawford MA, Lascols C, et al. Resistome of carbapenem- and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One.* 2018;13(6):1-22. doi:10.1371/journal.pone.0198526
9. Derakhshan S, Peerayeh SN, Bakhshi B. Association between presence of virulence

- genes and antibiotic resistance in clinical klebsiella pneumoniae isolates. *Lab Med.* 2016;47(4):306-311. doi:10.1093/labmed/lmw030
10. Huang YH, Chou SH, Liang SW, et al. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(8):2039-2046. doi:10.1093/jac/dky164
 11. Ecdc. *SURVEILLANCE REPORT. Surveillance of Antimicrobial Resistance in Europe 2018.*; 2018. www.ecdc.europa.eu. Accessed January 6, 2021.
 12. Jiang F, Kong Z, Cheng C, Kang H, Gu B, Ma P. Overestimated discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry for typing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clones. *Epidemiol Infect.* 2019. doi:10.1017/S0950268819002097
 13. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, et al. Biotyping of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates from France and Algeria Using MALDI-TOF MS. *PLoS One.* 2013;8(4). doi:10.1371/journal.pone.0061428
 14. Procop GW, Church, DL., Hall GS., Janda WM., Koneman EW., Schreckenberger PC. WG. The Enterobacteriaceae. In: *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology.* 7. Bask1. Wolters Kluwer Health; 2017:213-315.
 15. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(3):925-932. doi:10.1099/00207713-51-3-925
 16. Imai K, Ishibashi N, Kodana M, et al. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infect Dis.* 2019;19(1):1-10. doi:10.1186/S12879-019-4498-X/TABLES/5
 17. <https://www.uptodate.com>. Yu WL, Chuang YC. Microbiology and pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* infection.
 18. Washington JA. Laboratory approaches to the identification of enterobacteriaceae.

- Hum Pathol.* 1976;7(2):151-159. doi:10.1016/S0046-8177(76)80018-4
19. O'Hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(1):147-162. doi:10.1128/CMR.18.1.147-162.2005
 20. Dingle TC, Butler-Wu SM. MALDI-TOF mass spectrometry for microorganism identification. *Clin Lab Med.* 2013;33(3):589-609. doi:10.1016/j.cll.2013.03.001
 21. Case 71. <https://pathos223.com/en/case/case071.htm>.
 22. bioMérieux | Pioneering diagnostics. <https://www.biomerieux.com.tr/>.
 23. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/srep15573
 24. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol.* 2014;9(9):1071-1081. doi:10.2217/fmb.14.48
 25. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: A long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep.* 2014;6. doi:10.12703/P6-64
 26. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: Living to counteract host defences. *FEMS Microbiol Rev.* 2019;43(2):123-144. doi:10.1093/femsre/fuy043
 27. Fleeman RM, Macias LA, Brodbelt JS, Davies BW. Defining principles that influence antimicrobial peptide activity against capsulated *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(44):27620-27626. doi:10.1073/pnas.2007036117
 28. Patro LPP, Rathinavelan T. Targeting the Sugary Armor of *Klebsiella* Species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019;9:367. doi:10.3389/fcimb.2019.00367
 29. Whitfield C, Stephen Trent M. Biosynthesis and export of bacterial lipopolysaccharides. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:99-128. doi:10.1146/annurev-biochem-060713-035600

30. Rollenske T, Szijarto V, Lukasiwicz J, et al. Cross-specificity of protective human antibodies against *Klebsiella pneumoniae* LPS O-antigen. *Nat Immunol.* 2018;19(6):617-624. doi:10.1038/s41590-018-0106-2
31. Artyszuk D, Izdebski R, Maciejewska A, et al. The impact of insertion sequences on o-serotype phenotype and its O-locus-based prediction in *klebsiella pneumoniae* O2 and O1. *Int J Mol Sci.* 2020;21(18):1-15. doi:10.3390/ijms21186572
32. Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(NOV):483. doi:10.3389/fcimb.2017.00483
33. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Microbiol Rev.* 2019;32(3). doi:10.1128/CMR.00001-19
34. Huynh DTN, Kim AY, Seol IH, et al. Inactivation of the virulence factors from 2,3-butanediol-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2015;99(22):9427-9438. doi:10.1007/s00253-015-6861-1
35. Candan ED, Aksöz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(4):867-874. doi:10.18388/ABP.2015_1148
36. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(1):1-6. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007
37. Xue J, Tan B, Yang S, et al. Influence of cAMP receptor protein (CRP) on bacterial virulence and transcriptional regulation of *allS* by CRP in *Klebsiella pneumoniae*. *Gene.* 2016;593(1):28-33. doi:10.1016/j.gene.2016.08.006
38. Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella Pneumoniae*: A new and dangerous breed. *Virulence.* 2013;4(2):107-118. doi:10.4161/viru.22718
39. Catalán-Nájera JC, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and

- hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes? *Virulence*. 2017;8(7):1111-1123. doi:10.1080/21505594.2017.1317412
40. Russo TA, Olson R, Fang CT, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9). doi:10.1128/JCM.00776-18
 41. Eisenmenger EF, Guajardo E, Finch N, Atmar RL, Sargsyan Z. ‘String Test’ for Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*. *Am J Med*. 2021;134(10):e520-e521. doi:10.1016/J.AMJMED.2021.03.047
 42. Huynh BT, Passet V, Rakotondrasoa A, et al. *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes*. 2020;11(5):1287-1299. doi:10.1080/19490976.2020.1748257
 43. Gorrie CL, Mirc Eta M, Wick RR, et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clin Infect Dis*. 2017;65(2):208-215. doi:10.1093/cid/cix270
 44. Ashurst J V., Dawson A. *Pneumonia, Klebsiella*. StatPearls Publishing; 2018. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30085546>.
 45. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* – clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 2020;287(3):283-300. doi:10.1111/joim.13007
 46. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: A major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252-275. doi:10.1093/femsre/fux013
 47. Liao W, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over the last 10 years. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020;23:174-180. doi:10.1016/j.jgar.2020.09.004
 48. Temkin E, Fallach N, Almagor J, Gladstone BP, Tacconelli E, Carmeli Y. Estimating the number of infections caused by antibiotic-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in 2014: a modelling study. *Lancet Glob Heal*.

2018;6(9):e969-e979. doi:10.1016/S2214-109X(18)30278-X

49. CAESAR 2020.
https://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0003/469200/Central-Asian-and-European-Surveillance-of-Antimicrobial-Resistance.-Annual-report-2020-eng.pdf.
Accessed January 22, 2021.
50. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(June). doi:10.1038/s41579-019-0315-1
51. Lee GC, Burgess DS. Treatment of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase (KPC) infections: A review of published case series and case reports. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2012;11:32. doi:10.1186/1476-0711-11-32
52. Ahmad N, Alspaugh JA, Drew .W. Lawrence, et al. Antibacterial Agents and Resistance. In: Ryan KJ, ed. *Sherris Medical Microbiology*. 7th ed. Mc Graw Hill Education; 2018:431-458.
53. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*. 2017;131:185-195. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.022
54. El-Sayed Ahmed MAEG, Zhong LL, Shen C, Yang Y, Doi Y, Tian GB. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):868-885. doi:10.1080/22221751.2020.1754133
55. Grégoire N, Aranzana-Climent V, Magréault S, Marchand S, Couet W. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Colistin. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(12):1441-1460. doi:10.1007/s40262-017-0561-1
56. Bandick RG, Mousavi S, Bereswill S, Heimesaat MM. Review of therapeutic options for infections with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Microbiol Immunol*. 2020;10(3):115-124. doi:10.1556/1886.2020.00022
57. Bush K. Past and present perspectives on β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(10). doi:10.1128/AAC.01076-18
58. Philippon A, Slama P, Dény P, Labia R. A structure-based classification of class A β -Lactamases, a broadly diverse family of enzymes. *Clin Microbiol Rev*.

- 2016;29(1):29-57. doi:10.1128/CMR.00019-15
59. Sawa T, Kooguchi K, Moriyama K. Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J Intensive Care*. 2020;8(1). doi:10.1186/s40560-020-0429-6
 60. Tooke CL, Hinchliffe P, Bragginton EC, et al. β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J Mol Biol*. 2019;431(18):3472-3500. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002
 61. Porreca AM, Sullivan K V., Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*. 2018;20(6):1-12. doi:10.1007/s11908-018-0617-x
 62. Bonnin RA, Jousset AB, Urvoy N, et al. Detection of GES-5 carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a newcomer in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(3). doi:10.1128/AAC.02263-16
 63. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci*. 2013;1277(1):91-104. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x
 64. Weng X, Shi Q, Wang S, Shi Y, Sun D, Yu Y. The Characterization of OXA-232 Carbapenemase-Producing ST437 *Klebsiella pneumoniae* in China. *Can J Infect Dis Med Microbiol*. 2020;2020. doi:10.1155/2020/5626503
 65. Antunes NT, Fisher JF. Acquired class D β -Lactamases. *Antibiotics*. 2014;3(3):398-434. doi:10.3390/antibiotics3030398
 66. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2020;33(1). doi:10.1128/CMR.00102-19
 67. Pal A, Tripathi A. Quercetin inhibits carbapenemase and efflux pump activities among carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *APMIS*. 2020;128(3):251-259. doi:10.1111/apm.13015
 68. Hamzaoui Z, Ocampo-Sosa A, Maamar E, et al. An Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae*, Associated with OmpK35 and OmpK36 Porin Loss in Tunisia. *Microb Drug Resist*. 2018;24(8):1137-1147. doi:10.1089/mdr.2017.0165

69. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(10):5696-5703. doi:10.1128/AAC.03110-14
70. Anyanwu MU, Jaja IF, Nwobi OC. Occurrence and characteristics of mobile colistin resistance (Mcr) gene-containing isolates from the environment: A review. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(3). doi:10.3390/ijerph17031028
71. Menekşe Ş, Çağ Y, Işık ME, et al. The effect of colistin resistance and other predictors on fatality among patients with bloodstream infections due to *Klebsiella pneumoniae* in an OXA-48 dominant region. *Int J Infect Dis.* 2019;86:208-211. doi:10.1016/j.ijid.2019.06.008
72. Guducuoglu H, Gursoy NC, Yakupogullari Y, et al. Hospital outbreak of a colistin-resistant, NDM-1- And OXA-48-producing *klebsiella pneumoniae*: High mortality from pandrug resistance. *Microb Drug Resist.* 2018;24(7):966-972. doi:10.1089/mdr.2017.0173
73. Martinez-Martinez L, Cantón Spain R, Stefani S, et al. *EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance.*; 2017.
74. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic detection of carbapenemase-producing organisms from clinical isolates. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11). doi:10.1128/JCM.01140-18
75. Zhong H, Wu ML, Feng WJ, Huang SF, Yang P. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in Enterobacteriaceae: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:138-147. doi:10.1016/j.jgar.2019.10.010
76. Seah C, Low DE, Patel SN, Melano RG. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2011;49(5):1965-1969. doi:10.1128/JCM.00203-11
77. Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. Triton Hodge Test:

- Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):640-649. doi:10.1128/JCM.01298-15
78. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2017;55(8):2321-2333. doi:10.1128/JCM.00193-17
 79. Van Der Zwaluw K, De Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, De Neeling AJ, Schouls LM. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low-Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram-Negative Rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0123690
 80. Bouslah Z. Carba NP test for the detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Infect.* 2020;50(6):466-479. doi:10.1016/j.medmal.2019.12.002
 81. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, et al. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2986-2990. doi:10.1128/JCM.00901-13
 82. Carba NP Test (CNPt): Principle, Procedure, Results • Microbe Online. <https://microbeonline.com/carba-np-test-principle-procedure-results/>.
 83. Waheed A, Saleem S, Shahzad N, et al. Prevalence of Extended Spectrum β -lactamase SHV and OXA Producing Gram Negative Bacteria at Tertiary Care Hospital of Lahore, Pakistan. *Pak J Zool.* 2019;51(6):2345-2351. doi:10.17582/JOURNAL.PJZ/2019.51.6.2345.2351
 84. Panagea T, Galani I, Souli M, Adamou P, Antoniadou A, Giamarellou H. Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rectal surveillance cultures. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(2):124-128. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.10.010
 85. Schubert S, Kostrzewa M. MALDI-TOF MS in the microbiology laboratory: Current trends. *Curr Issues Mol Biol.* 2017;23:17-20. doi:10.21775/cimb.023.017

86. Feng B, Shi H, Xu F, et al. FTIR-assisted MALDI-TOF MS for the identification and typing of bacteria. *Anal Chim Acta*. 2020;1111:75-82. doi:10.1016/j.aca.2020.03.037
87. Patel R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clin Chem*. 2015;61(1):100-111. doi:10.1373/clinchem.2014.221770
88. Lavigne JP, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. Mass spectrometry: A revolution in clinical microbiology? *Clin Chem Lab Med*. 2013;51(2):257-270. doi:10.1515/CCLM-2012-0291
89. Oviaño M, Bou G. Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for the rapid detection of antimicrobial resistance mechanisms and beyond. *Clin Microbiol Rev*. 2019;32(1). doi:10.1128/CMR.00037-18
90. Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(2):133-144. doi:10.1016/J.CMI.2017.08.030
91. Oho M, Funashima Y, Nagasawa Z, Miyamoto H, Sueoka E. Rapid detection method of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae by MALDI-TOF MS with imipenem/cilastatin (KB) disc and zinc sulfate solution. *J Infect Chemother*. September 2020. doi:10.1016/j.jiac.2020.09.013
92. Yaşar-Duman M, Çilli FF. Investigation of the presence of carbapenemases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains by MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry) and comparison with real-time PCR method. *Indian J Med Microbiol*. 2021;39(3):300-305. doi:10.1016/J.IJMMB.2021.03.013
93. Glupczynski Y, Evrard S, Huang T-D, Bogaerts P. Evaluation of the RESIST-4 K-SeT assay, a multiplex immunochromatographic assay for the rapid detection of OXA-48-like, KPC, VIM and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2019;74(5):1284-1287. doi:10.1093/jac/dkz031
94. Song W, Park MJ, Jeong S, et al. Rapid Identification of OXA-48-like, KPC, NDM, and VIM Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae from Culture: Evaluation of the RESIST-4 O.K.N.V. Multiplex lateral flow assay. *Ann Lab Med*.

2020;40(3):259-263. doi:10.3343/alm.2020.40.3.281

95. Potron A, Fournier D, Emeraud C, et al. Evaluation of the immunochromatographic NG-test CARbA 5 for rapid identification of carbapenemase in nonfermenters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(9). doi:10.1128/AAC.00968-19
96. Coris Bioconcept. <https://www.corisbio.com/products/oknvi-resist-5/>.
97. Rood IGH, Li Q. Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2017;89(3):245-250. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.07.013
98. Khorvash F, Yazdani M, Soudi A, Shabani S, Tavahen N. Prevalence of Acquired Carbapenemase Genes in Klebsiella Pneumoniae by Multiplex PCR in Isfahan. *Adv Biomed Res.* 2017;6(1):41. doi:10.4103/2277-9175.204594
99. Lupo A, Papp-Wallace KM, Sendi P, Bonomo RA, Endimiani A. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(3):179-194. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.06.001
100. Yadav S, Kapley A. Antibiotic resistance: Global health crisis and metagenomics. *Biotechnol Reports.* 2021;29:e00604. doi:10.1016/J.BTRE.2021.E00604
101. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene bla(IMP) among clinically isolated strains of Serratia marcescens. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(4):824-829. doi:10.1128/AAC.39.4.824
102. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing Klebsiella pneumoniae isolate in Turkey [1]. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(7):695-696. doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01480.x
103. David S, Reuter S, Harris SR, et al. Epidemic of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol.* 2019;4(11):1919-1929. doi:10.1038/s41564-019-0492-8
104. Lai K, Ma Y, Guo L, An J, Ye L, Yang J. Molecular characterization of clinical IMP-producing Klebsiella pneumoniae isolates from a Chinese Tertiary Hospital.

Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):42. doi:10.1186/s12941-017-0218-9

105. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of bla(VIM), a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-1590. doi:10.1128/aac.43.7.1584
106. Midilli K, Aygün G, Kuşkucu M, Yaşar H, Ergin S AK. A new variant of metallo- β -lactamase detected in a *Klebsiella pneumoniae* strain: VIM-5. In: *KLIMIK Congress*. Istanbul; 2003:275.
107. Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev.* 2005;18(2):306-325. doi:10.1128/CMR.18.2.306-325.2005
108. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153-163. doi:10.1016/S1473-3099(16)30257-2
109. Esposito EP, Gaiarsa S, Del Franco M, et al. A novel IncA/C1 group conjugative plasmid, encoding VIM-1 metallo-beta-lactamase, mediates the acquisition of carbapenem resistance in ST104 *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonates in the intensive care unit of V. Monaldi Hospital in Naples. *Front Microbiol.* 2017;8(NOV). doi:10.3389/fmicb.2017.02135
110. Dziri R, Ayari I, Barguelli F, Ouzari HI, El Asli MS, Klibi N. First Report of NDM and VIM Coproducing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia and Emergence of Novel Clones. *Microb Drug Resist.* 2019;25(9):1282-1286. doi:10.1089/mdr.2019.0115
111. Liang Z, Li L, Wang Y, et al. Molecular basis of NDM-1, a new antibiotic resistance determinant. *PLoS One.* 2011;6(8):23606. doi:10.1371/journal.pone.0023606
112. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(5):2784-2785. doi:10.1128/AAC.00150-12

113. Politi L, Gartzonika K, Spanakis N, et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece: evidence of a widespread clonal outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2019;74(8):2197-2202. doi:10.1093/jac/dkz176
114. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009;9(4):228-236. doi:10.1016/S1473-3099(09)70054-4
115. Labarca J, Poirel L, Özdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes New Infect.* 2014;2(2):50-51. doi:10.1002/nmi2.42
116. Tekeli A, Dolapci I, Evren E, Oguzman E, Karahan ZC. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. *Microb Drug Resist.* 2020;26(2):118-125. doi:10.1089/mdr.2019.0086
117. Zhao Y, Zhang S, Fang R, et al. Dynamic Epidemiology and Virulence Characteristics of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Wenzhou, China from 2003 to 2016. *Infect Drug Resist.* 2020;13:931. doi:10.2147/IDR.S243032
118. Fontana C, Angeletti S, Mirandola W, et al. Whole genome sequencing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Evolutionary analysis for outbreak investigation. *Future Microbiol.* 2020;15(3):203-212. doi:10.2217/fmb-2019-0074
119. Bakthavatchalam YD, Anandan S, Veeraraghavan B. Laboratory detection and clinical implication of oxacillinase-48 like carbapenemase: The hidden threat. *J Glob Infect Dis.* 2016;8(1):41-50. doi:10.4103/0974-777X.176149
120. Gorgulho A, Grilo AM, de Figueiredo M, Selada J. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in a portuguese hospital – a five-year retrospective study. *GERMS.* 2020;10(2):95-103. doi:10.18683/germs.2020.1190
121. Mataseje LF, Boyd DA, Fuller J, et al. Characterization of OXA-48-like carbapenemase producers in Canada, 2011–14. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(3):626-633. doi:10.1093/JAC/DKX462
122. Can F, Menekse S, Ispir P, et al. Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Antimicrob*

- Chemother.* 2018;73(5):1235-1241. doi:10.1093/jac/dkx532
123. Riley LW, Blanton RE. Advances in Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: Definitions, Approaches, and Scope of the Field *. *Microbiol Spectr.* 2018;6(6). doi:10.1128/microbiolspec.ame-0001-2018
 124. Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: A how-to guide. *New Microbiol.* 2014;37(1):1-15.
 125. Neoh H min, Tan XE, Sapri HF, Tan TL. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE): A review of the “gold standard” for bacteria typing and current alternatives. *Infect Genet Evol.* 2019;74:103935. doi:10.1016/j.meegid.2019.103935
 126. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, et al. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(6):3140-3145. doi:10.1073/pnas.95.6.3140
 127. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. *Trends Microbiol.* 1999;7(12):482-487. doi:10.1016/S0966-842X(99)01609-1
 128. Cooper JE, Feil EJ. Multilocus sequence typing - What is resolved? *Trends Microbiol.* 2004;12(8):373-377. doi:10.1016/j.tim.2004.06.003
 129. Urwin R, Maiden MCJ. Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 2003;11(10):479-487. doi:10.1016/j.tim.2003.08.006
 130. Larsen M V., Cosentino S, Rasmussen S, et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-1361. doi:10.1128/JCM.06094-11
 131. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J Bacteriol.* 2004;186(5):1518-1530. doi:10.1128/JB.186.5.1518-1530.2004
 132. Jolley KA, Bliss CM, Bennett JS, et al. Ribosomal multilocus sequence typing:

- Universal characterization of bacteria from domain to strain. *Microbiology*. 2012;158(4):1005-1015. doi:10.1099/mic.0.055459-0
133. Kimura B. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? *Food Microbiol*. 2018;75:28-36. doi:10.1016/j.fm.2017.09.003
 134. De Been M, Pinholt M, Top J, et al. Core genome multilocus sequence typing scheme for high-resolution typing of enterococcus faecium. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3788-3797. doi:10.1128/JCM.01946-15
 135. Liang KYH, Orata FD, Tarekul Islam M, et al. A Vibrio cholerae Core Genome Multilocus Sequence Typing Scheme to Facilitate the Epidemiological Study of Cholera. *J Bacteriol*. 2020;202(24). doi:10.1128/JB.00086-20
 136. Persing DH, Tenover FC, Hayden RT, et al., eds. *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Third Edit. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 2016.
 137. Herschleb J, Ananiev G, Schwartz DC. Pulsed-field gel electrophoresis. *Nat Protoc*. 2007;2(3):677-684. doi:10.1038/nprot.2007.94
 138. Parizad EG, Parizad EG, Valizadeh A. The application of pulsed field gel electrophoresis in clinical studies. *J Clin Diagnostic Res*. 2016;10(1):DE01-DE04. doi:10.7860/JCDR/2016/15718.7043
 139. Maule J. Pulsed-field gel electrophoresis. *Appl Biochem Biotechnol - Part B Mol Biotechnol*. 1998;9(2):107-126. doi:10.1007/BF02760813
 140. Goering R V. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. *Infect Genet Evol*. 2010;10(7):866-875. doi:10.1016/j.meegid.2010.07.023
 141. Hacioglu E, Basim LU. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Technique and its use in Molecular Biology. *Turkish J Biol*. 2001;25(4):405-418.
 142. Lukács G, Takó M, Nyilasi I. Pulsed-field gel electrophoresis: A versatile tool for analysis of fungal genomes: A review. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2006;53(1):95-104. doi:10.1556/AMicr.53.2006.1.7
 143. Blöcher D, Kunhi M. DNA double-Strand break analysis by CHEF electrophoresis.

Int J Radiat Biol. 1990;58(1):23-34. doi:10.1080/09553009014551411

144. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J Clin Microbiol.* 1995;33(9).
145. Sabat AJ, Budimir A, Nashev D, et al. Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance. *Eurosurveillance.* 2013;18(4):20380. doi:10.2807/ese.18.04.20380-en
146. Sauget M, Valot B, Bertrand X, Hocquet D. Can MALDI-TOF Mass Spectrometry Reasonably Type Bacteria? *Trends Microbiol.* 2017;25(6):447-455. doi:10.1016/j.tim.2016.12.006
147. Bar-Meir M, Berliner E, Kashat L, Zeevi DA, Assous M V. The utility of MALDI-TOF MS for outbreak investigation in the neonatal intensive care unit. *Eur J Pediatr.* 2020;179(12):1843-1849. doi:10.1007/s00431-020-03696-3
148. Akbaş E, Abacıoğlu H, Ötgün SN. *Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi, Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi 2. Cilt.* Ankara; 2014.
149. EUCAST 2020.
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf.
150. Cicek AC, Saral A, Duzgun AO, et al. Nationwide study of Escherichia coli producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *J Antibiot (Tokyo).* 2013;66:647-650. doi:10.1038/ja.2013.72
151. Hanson ND, Moland ES, Hossain A, Neville SA, Gosbell IB, Thomson KS. Unusual Salmonella enterica serotype Typhimurium isolate producing CMY-7, SHV-9 and OXA-30 β -lactamases. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(6):1011-1014. doi:10.1093/JAC/DKF052
152. Xu L, Ensor V, Gossain S, Nye K, Hawkey P. Rapid and simple detection of bla CTX-M genes by multiplex PCR assay. *J Med Microbiol.* 2005;54:1183-1187. doi:10.1099/jmm.0.46160-0

153. Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3579-3581. doi:10.1128/AAC.00072-09
154. Celenza G, Pellegrini C, Caccamo M, Segatore B, Amicosante G, Perilli M. Spread of blaCTX-M-type and blaPER-2 β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(5):975-978. doi:10.1093/JAC/DKL055
155. Schechner V, Straus-Robinson K, Schwartz D, et al. Evaluation of PCR-Based Testing for Surveillance of KPC-Producing Carbapenem-Resistant Members of the Enterobacteriaceae Family. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3261. doi:10.1128/JCM.02368-08
156. Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, et al. Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23 β -Lactamase in Korea. *J Clin Microbiol*. 2005;43(5):2241. doi:10.1128/JCM.43.5.2241-2245.2005
157. Cicek AC, Saral A, Iraz M, et al. OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(5):410-415. doi:10.1111/1469-0691.12338
158. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004
159. Huang Y, Li J, Gu D, et al. Rapid detection of K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* by MALDI-TOF MS. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1435. doi:10.3389/FMICB.2015.01435/BIBTEX
160. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Jpn J Infect Dis*. 2009;62(5):372-377.
161. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol*.

2005;43(8):4178-4182. doi:10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005

162. Antimicrobial Resistance Division; Global Antimicrobial Resistance Surveillance System; Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS); Surveillance Prevention & Control, Agnew E, Dolecek C, et al. *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report.*; 2021. <http://www.who.int/glass/resources/publications/early-implementation-report-2020/en/>.
163. Nguyen TNT, Nguyen PLN, Le NTQ, et al. Emerging carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 16 causing multiple outbreaks in a tertiary hospital in southern Vietnam. *Microb Genomics*. 2021;7(3). doi:10.1099/MGEN.0.000519
164. Pei N, Liu Q, Cheng X, et al. Longitudinal Study of the Drug Resistance in *Klebsiella pneumoniae* of a Tertiary Hospital, China: Phenotypic Epidemiology Analysis (2013-2018). *Infect Drug Resist*. 2021;14:613-626. doi:10.2147/IDR.S294989
165. Süzük Yildiz S, Şimşek H, Bakkaloğlu Z, et al. [The Epidemiology of Carbapenemases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated in 2019 in Turkey]. *Mikrobiyol Bul*. 2021;55(1):1-16. doi:10.5578/MB.20124
166. Unlu O, Demirci M. Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring carbapenemase, beta-lactamase and quinolone resistance genes in intensive care unit patients. *GMS Hyg Infect Control*. 2020;15:Doc31. doi:10.3205/DGKH000366
167. Miao M, Wen H, Xu P, et al. Genetic diversity of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) clinical isolates from a Tertiary Hospital in Eastern China. *Front Microbiol*. 2019;10(JAN):1-8. doi:10.3389/fmicb.2018.03341
168. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016;3(1):15. doi:10.1177/2049936115621709
169. Huang H, Dong N, Shu L, et al. Colistin-resistance gene *mcr* in clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae strains in China, 2014–2019. *Emerg Microbes Infect*. 2020;9(1):237. doi:10.1080/22221751.2020.1717380

170. Lo-Ten-Foe JR, De Smet AMGA, Diederens BMW, Kluytmans JAJW, Van Keulen PHJ. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(10):3726-3730. doi:10.1128/AAC.01406-06/FORMAT/EPUB
171. Büyüktuna SA, Hasbek M, Çelik C, et al. [Klebsiella pneumoniae Infections in the Intensive Care Unit: Risk Factors Related to Carbapenem Resistance and Patient Mortality]. *Mikrobiyol Bul.* 2020;54(3):378-391. doi:10.5578/MB.69679
172. Arabacı Ç, Dal T, Başyigit T, Genişel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and mcr-1 genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Infect Dev Ctries.* 2019;13(06):504-509. doi:10.3855/jidc.11048
173. Shu L Bin, Lu Q, Sun RH, et al. Prevalence and phenotypic characterization of carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* strains recovered from sputum and fecal samples of ICU patients in Zhejiang Province, China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:11-18. doi:10.2147/IDR.S175823
174. Cizmeci Z, Aktas E, Otlu B, Acikgoz O, Ordekci S. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48- endemic area. *J Chemother.* 2017;29(6):344-350. doi:10.1080/1120009X.2017.1323149
175. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-Encoded Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase OXA-48 in an Imipenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Strain from Belgium. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(9):3463. doi:10.1128/AAC.00543-08
176. Sağiroğlu P, Hasdemir U, Altınkanat Gelmez G, Aksu B, Karatuna O, Söyletir G. Performance of “RESIST-3 O.K.N. K-SeT” immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Brazilian J Microbiol.* 2018;49(4):885-890. doi:10.1016/j.bjm.2018.02.002
177. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella*

- pneumoniae, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873. doi:10.1128/AAC.01019-15
178. Alp E, Perçin D, Colakoğlu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *J Hosp Infect.* 2013;84(2):178-180. doi:10.1016/J.JHIN.2013.03.002
 179. Genç S, Kolaylı F, Özçelik EY. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first *K.pneumoniae* isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. *J Infect Chemother.* 2022;28(2):192-198. doi:10.1016/J.JIAC.2021.10.009
 180. Çakar A, Akyön Y, Gür D, et al. Türkiye’de 2014 Yılı İçinde İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Varlığının Araştırılması* Investigation of Carbapenemases in Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated in 2014 in Turkey. *Mikrobiyol Bul.* 2016;50(1):21-33. doi:10.5578/mb.10695
 181. Ye Y, Xu L, Han Y, Chen Z, Liu C, Ming L. Mechanism for carbapenem resistance of clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *Exp Ther Med.* 2018;15(1):1143. doi:10.3892/ETM.2017.5485
 182. Arakawa Y. Systematic research to overcome newly emerged multidrug-resistant bacteria. *Microbiol Immunol.* 2020;64(4):231-251. doi:10.1111/1348-0421.12781
 183. Erdem F, Oncul O, Aktas Z. Characterization of Resistance Genes and Polymerase Chain Reaction-Based Replicon Typing in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Microb Drug Resist.* 2019;25(4):551-557. doi:10.1089/MDR.2018.0231
 184. Zhang Y, Jin L, Ouyang P, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(2):327-336. doi:10.1093/JAC/DKZ446
 185. Ali AM, Al-Kakei SN. Virulence factors genotyping of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from Baghdad. *Rev Med Microbiol.* 2019;30(1):36-46. doi:10.1097/MRM.0000000000000151

186. Kuş H, Arslan U, Türk Dağı H, et al. Hastane Enfeksiyonu Etkeni Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması Investigation of Various Virulence Factors of Klebsiella pneumoniae strains Isolated from Nosocomial Infections. doi:10.5578/mb.59716
187. Ssekatawa K, Byarugaba DK, Nakavuma JL, et al. Prevalence of pathogenic Klebsiella pneumoniae based on PCR capsular typing harbouring carbapenemases encoding genes in Uganda tertiary hospitals. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2021;10(1):1-10. doi:10.1186/S13756-021-00923-W/TABLES/6
188. Cointe A, Bonacorsi S, Truong J, et al. Detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in positive blood culture using an immunochromatographic Resist-4 O.K.N.V. Assay. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(12). doi:10.1128/AAC.01828-18
189. Hazirolan G, Karagoz A. Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant Klebsiella pneumoniae ST101 high-risk clone in Turkey. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 2020;67(4):216-221. doi:10.1556/030.2020.01275
190. Tenover FC, Arbeit RD, Goering R V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997;18(6):426-439. doi:10.1086/647644
191. Di Tella D, Tamburro M, Guerrizio G, Fanelli I, Sammarco ML, Ripabelli G. Molecular Epidemiological Insights into Colistin-Resistant and Carbapenemases-Producing Clinical Klebsiella pneumoniae Isolates. *Infect Drug Resist*. 2019;12:3783. doi:10.2147/IDR.S226416
192. Sakai Y, Gotoh K, Nakano R, et al. Infection Control for a Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Outbreak in an Advanced Emergency Medical Services Center. *Antibiot* 2021, Vol 10, Page 1537. 2021;10(12):1537. doi:10.3390/ANTIBIOTICS10121537
193. Hosbul T, Guney-Kaya K, Guney M, Sakarya S, Bozdogan B, Oryasin E. Carbapenem and Colistin Resistant Klebsiella Pneumoniae ST14 and ST2096

- Dominated in Two Hospitals in Turkey. *Clin Lab*. 2021;67(9):2035-2041. doi:10.7754/CLIN.LAB.2021.201226
194. Czobor I, Novais Â, Rodrigues C, et al. Efficient transmission of IncFIIY and IncL plasmids and *Klebsiella pneumoniae* ST101 clone producing OXA-48, NDM-1 or OXA-181 in Bucharest hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(2):223-224. doi:10.1016/J.IJANTIMICAG.2016.05.004
 195. Yoon EJ, Kim JO, Kim D, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers in South Korea between 2013 and 2015. *Front Microbiol*. 2018;9(JAN):56. doi:10.3389/FMICB.2018.00056/BIBTEX
 196. Qin X, Wu S, Hao M, et al. The Colonization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Resistance Mechanisms, and Risk Factors in Patients Admitted to Intensive Care Units in China. *J Infect Dis*. 2020;221(Supplement_2):S206-S214. doi:10.1093/INFDIS/JIZ622
 197. Andrey DO, Dantas PP, Martins WBS, et al. An emerging clone, *klebsiellapneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* sequence type 16, associated with high mortality rates in a CC258-endemic setting. *Clin Infect Dis*. 2020;71(7):E141-E150. doi:10.1093/cid/ciz1095
 198. Giacometti F, Piva S, Vranckx K, et al. Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *Int J Food Microbiol*. 2018;277(October 2017):50-57. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2018.04.026
 199. Raina V, Nayak T, Ray L, Kumari K, Suar M. A Polyphasic Taxonomic Approach for Designation and Description of Novel Microbial Species. *Microb Divers Genomic Era*. January 2019:137-152. doi:10.1016/B978-0-12-814849-5.00009-5

Sayı : 71006170-050.01.04-991
Konu : Etik Kurul

04.05.2020

Sayın Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK

Üniversitemiz Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna yapmış olduğunuz "**Karbapenem Duyarlı Olmayan Klebsiella Pneumoniae İzolatlarının MLST, MALDI-TOF, PFGE İle Moleküler Epidemiyolojisinin İncelenmesi**" isimli başvurunuz etik kurulumuz yönergesine göre **30.04.2020** tarihinde yapmış olduğunuz toplantıda incelenmiş olup, **2020/44** karar numarası ile bilimsel ve etik yönden **uygun** bulunmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini saygılarımla rica ederim.

 **e-imzalıdır**
Prof. Dr. Hüseyin Avni UYDU
Başkan

