



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARINDA KARBAPENEM  
VE KOLİSTİN DİRENÇ MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Neslihan GENİŞEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kadri GÜL

DİYARBAKIR-2020





TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARINDA KARBAPENEM  
VE KOLİSTİN DİRENÇ MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER  
OLARAK ARAŞTIRILMASI**

Ecz. Neslihan GENİŞEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kadri GÜL

DİYARBAKIR-2020



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**ONAY**

Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Neslihan Genişel'in hazırladığı "Enterobacteriaceae İzolatlarında Karbapenem ve Kolistin Direnç Mekanizmalarının Moleküler Olarak Araştırılması" başlıklı tez Dicle Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:10/07/2020

Danışman Prof. Dr. Kadri Gül \_\_\_\_\_

**Jüri Üyeleri**

İmza

|              |                                |       |
|--------------|--------------------------------|-------|
| Jüri Başkanı | Prof. Dr. Mahmut METE          | _____ |
| Üye          | Prof. Dr. Kadri GÜL            | _____ |
| Üye          | Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT      | _____ |
| Üye          | Prof. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ      | _____ |
| Üye          | Prof. Dr. Fadile Yıldız ZEYREK | _____ |

Bu tez Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ....../.../20.. tarih ve .... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

...../...../.....

Prof. Dr. Hakkı Murat BİLGİN  
Dicle Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

10/07/2020

Neslihan GENİŞEL

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca büyük bir özveri ile bana her konuda destek olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, yol gösteren, çok değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Kadri GÜL'e,

Yine doktora eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda desteklerini hissettiğim, bana her zaman yardımcı olan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Mahmut METE, Prof. Dr. Selahattin ATMACA, Prof. Dr. Nezahat AKPOLAT, Prof. Dr. Tuncer ÖZEKİNCİ hocalarıma,

Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Tıp Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarını ve bilgilerini bana açan, beraber çalışmaktan onur duyduğum Prof. Dr. Rıza DURMAZ ve Prof. Dr. Tuba DAL hocalarıma,

Destegini hiçbir zaman esirgemeyen, hedefe odaklanmamı hep hatırlatan sevgili arkadaşım Dr.Öğr. Üyesi Nida ÖZCAN'a,

Tez aşamasında tecrübelerini benimle paylaşan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Uzm. Dr. Ekrem YAŞAR'a,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndaki diğer tüm çalışanlara,

Beni bu zorlu süreçte maddi manevi yalnız bırakmayan her zaman desteklerini hissettiğim çok kıymetli annem Şadiye ve babam Ali Vehbi KÜLAHLIOĞLU'na, en yakın arkadaşım kız kardeşim Dr. Nagihan KÜLAHLIOĞLU'na ve hayat boyu yol gösterici olan abim Dr. Adem KÜLAHLIOĞLU'na,

Ve son olarak her koşulda yanımda olan fikirleriyle ufkumu açan sevgili eşim Dr. Öğr. Üyesi M. Fatih GENİŞEL'e ve akademik hayatın her türlü zorluğuna beraber göğüs gerdiğimiz yaşam enerjim yavrum Yavuz Ali'ye

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

Neslihan GENİŞEL

Diyarbakır 2020

## İÇİNDEKİLER

|                                                |          |
|------------------------------------------------|----------|
| ONAY .....                                     | i        |
| BEYAN.....                                     | i        |
| TEŞEKKÜR.....                                  | ii       |
| İÇİNDEKİLER .....                              | iii      |
| KISALTMALAR LİSTESİ .....                      | vii      |
| TABLolar LİSTESİ .....                         | x        |
| ŞEKİLLER LİSTESİ.....                          | xi       |
| RESİMLER LİSTESİ.....                          | xiii     |
| GRAFİKLER LİSTESİ .....                        | xiv      |
| <b>1. ÖZETLER.....</b>                         | <b>1</b> |
| 1.1. Özet.....                                 | 1        |
| 1.2. Abstract.....                             | 3        |
| <b>2. GİRİŞ VE AMAÇ .....</b>                  | <b>5</b> |
| <b>3. GENEL BİLGİLER .....</b>                 | <b>8</b> |
| 3.1. Klebsiella pneumoniae.....                | 8        |
| 3.1.1. Virülans Faktörleri ve Patogenezi ..... | 9        |
| 3.1.2. Tedavi ve Direnç Sorunu .....           | 11       |
| 3.2. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler .....    | 14       |

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.1. Penisilinler .....                                             | 14 |
| 3.2.2. Sefalosporinler .....                                          | 15 |
| 3.2.3. Karbapenemler .....                                            | 19 |
| 3.2.4. Monobaktamlar .....                                            | 21 |
| 3.3. Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları .....                 | 22 |
| 3.3.1. İntrinsik direnç .....                                         | 22 |
| 3.3.2. Kazanılmış direnç .....                                        | 23 |
| 3.4. Beta -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları .....    | 24 |
| 3.4.1. Beta-laktamazlar .....                                         | 24 |
| 3.4.2. Genişletilmiş-Spektrumlu $\beta$ -Laktamazlar (GSBL) .....     | 28 |
| 3.5. Karbapenemler .....                                              | 28 |
| 3.5.1. Karbapenem Antimikrobiyalleri .....                            | 28 |
| 3.5.2. Karbapenemlerin Etki Mekanizması ve Yapı-Etki İlişkileri ..... | 29 |
| 3.5.3. Karbapenem Kullanımı ve Yan Etkileri .....                     | 30 |
| 3.5.4. Karbapenem Direnci .....                                       | 31 |
| 3.5.5. Karbapenemaz Tespit Yöntemleri .....                           | 37 |
| 3.6. Polimiksinler .....                                              | 42 |
| 3.6.1. Polimiksinlerin Yapısı ve Özellikleri .....                    | 42 |
| 3.6.2. Polimiksinlerin Etki Mekanizması .....                         | 44 |
| 3.6.3. Polimiksinlerin Klinik Kullanımı .....                         | 44 |
| 3.6.4. Polimiksinlere Karşı Direnç .....                              | 45 |

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.6.5. <i>mcr-1</i> 'in Keşfi .....                                                              | 50        |
| <b>4. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>                                                                   | <b>52</b> |
| 4.1. Örneklerin Toplanması .....                                                                 | 52        |
| 4.2. Suşların İdentifikasyonu .....                                                              | 52        |
| 4.2.1. Kan Kültür .....                                                                          | 52        |
| 4.2.2. MALDI-TOF MS .....                                                                        | 53        |
| 4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....                                                       | 53        |
| 4.3.1. BD Phoenix 100 Otomatize Sistemi .....                                                    | 53        |
| 4.3.2. Disk Difüzyon Testi (DDT) .....                                                           | 53        |
| 4.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD) .....                                                    | 54        |
| 4.4. Moleküler Yöntemler .....                                                                   | 57        |
| <b>5. BULGULAR .....</b>                                                                         | <b>62</b> |
| 5.1. Fenotipik Yöntemlere Ait Bulgular .....                                                     | 62        |
| 5.1.1. BD Phoenix <sup>TM</sup> 100 otomatize sistemine ait bulgular .....                       | 62        |
| 5.1.2. DDT (Kirby-Bauer) Yöntemine ait bulgular.....                                             | 63        |
| 5.1.3. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemine Ait Bulgular.....                                      | 65        |
| 5.2. Moleküler Yöntemlere Ait Bulgular.....                                                      | 67        |
| 5.2.1. Karbapenemaz Genlerine Ait PCR Bulguları .....                                            | 67        |
| 5.2.2. Kolistin direnci ile ilişkili plazmid aracılı <i>mcr-1</i> genine ait PCR bulguları ..... | 69        |
| 5.3. Fenotipik ve Moleküler Yöntemlere Ait Bulgular.....                                         | 70        |
| <b>6. TARTIŞMA.....</b>                                                                          | <b>80</b> |

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| <b>7. SONUÇLAR.....</b>            | <b>87</b>  |
| <b>8. KAYNAKLAR .....</b>          | <b>89</b>  |
| <b>9. ÖZGEÇMİŞ.....</b>            | <b>105</b> |
| <b>10. EKLER .....</b>             | <b>106</b> |
| 10.1. Etik Kurul Onayı.....        | 106        |
| <b>11. ORJİNALLİK RAPORU .....</b> | <b>107</b> |



## KISALTMALAR LİSTESİ

**KDKp:** Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae*

**YBÜ:** Yoğun Bakım Ünitelerinden

**KKA:** Koyun Kanlı Agar

**EMB:** Eozin Metylen Blue

**SDA:** Sabouraud Dextroz Agar

**MALDI-TOF MS:** Matrix-Assisted Lazer Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry

**DDT:** Disk Difüzyon Test

**SMD:** Sıvı Mikrodilüsyon

**PCR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**CRKp:** Carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae*

**ÇİD:** Çoklu İlaça Dirençli

**GSBL:** Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

**MBL:** Metallo- $\beta$ -laktamazlar

**NDM:** New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase

**OXA:** Oxacillinase

**LPS:** Lipopolisakkarit

**MCR:** Mobilized Colistin Resistance

**OMP:** Dış Membran Proteinleri

**WHO:** Dünya Sağlık Örgütü

**APA:** Aminopenisillanik asit

**DHP-I:** Dehidropeptidaz I

**ESAC:** Extended-Spectrum AmpC

**PBP:** Penisilin Bağlayan Proteinler

**KRE:** Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae

**PBA:** Fenil Boronik Asit

**EDTA:** Etilen Diamin Tetra Asetik Asit

**NmcA:** Not Metalloenzyme Carbapenemase A

**SME:** Serratia marcescens Enzyme

**IMI:** Imipenem-hydrolysing-  $\beta$  lactamase

**SFC:** Serratia fonticola Carbapenemase

**GES:** Guiana Extended Spectrum

**SIM:** Seoul Imipenemase

**MHT:** Modifiye Hodge Test

**EUCAST:** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**AIM:** Antimikrobiyaller ve İnhibitörler Mikrobiyolojik Testi

**CNPt:** Carba NP Test

**LAMP:** Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon

**NGS:** Yeni Nesil Dizileme

**WGS:** Tüm Genom Dizileme

**CAMP:** Katyonik Antimikrobiyal Peptitler

**L- $\alpha$ - $\gamma$ -Dab:** L- $\alpha$ - $\gamma$ -diamino-bütirik asit

**CMS:** Kolistin Metansülfonat

**L-Ara4N:** 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz

**PEtN:** Fosfoetanolamin

**KAMHB:** Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth Besiyeri

## TABLÖLAR LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tablo 1: Beta-laktamazların sınıflandırılması.....                                                                                                                                                           | 26 |
| Tablo 2: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nden (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi'nden (EUCAST) polimiksinler için mevcut antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri ..... | 45 |
| Tablo 3: EUCAST karbapenem DDT inhibisyon zon çapı sınır değerleri .....                                                                                                                                     | 54 |
| Tablo 4: EUCAST SMD yöntemi ile Kolistin MİK sınır değerleri .....                                                                                                                                           | 54 |
| Tablo 5: Bu çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri .....                                                                                                                                               | 57 |
| Tablo 6: BD Phoenix otomatize sistem antibiyotik duyarlılık sonuçları .....                                                                                                                                  | 63 |
| Tablo 7: EUCAST karbapenem antimikrobisiderleri DDT zon çapı sınır değerleri ....                                                                                                                            | 64 |
| Tablo 8: Karbapenem* antibiyotiklerine karşı BD Phoenix 100 otomatize sisteminin sonuçları ve DDT zon çapları bulguları .....                                                                                | 64 |
| Tablo 9: SMD yöntemi ile elde edilen her bir izolatin MİK değeri ve duyarlılık durumu ve aynı izolatların otomatize sistem duyarlılık durumları .....                                                        | 66 |
| Tablo 10: PCR yöntemi ile tespit edilen karbapenemaz genlerinin dağılımı.....                                                                                                                                | 67 |
| Tablo 11: İzolatların karbapenemaz gen varlığına göre karbapenem* zon çapı ortalamaları. ....                                                                                                                | 72 |
| Tablo 12: Otomatize sistem ve SMD yöntemine göre kolistin duyarlılık bulgularının karşılaştırmasına ait bulgular .....                                                                                       | 72 |
| Tablo 13: Karbapenemazların mcr-1 pozitiflik bulguları .....                                                                                                                                                 | 78 |

## ŞEKİLLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1: Penisilin molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                       | 15 |
| Şekil 2: Sefalosporin molekül genel yapısı.....                                                                                                                                                                                                                              | 15 |
| Şekil 3: Birinci kuşak sefalosporinlerden Sefazolin molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                      | 16 |
| Şekil 4: İkinci kuşak sefalosporinlerden Sefoksitin molekül yapısı .....                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| Şekil 5: Üçüncü kuşak sefalosporinlerden Sefotaksim molekül yapısı .....                                                                                                                                                                                                     | 17 |
| Şekil 6: Dördüncü kuşak sefalosporinlerden Sefepim molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                       | 18 |
| Şekil 7: Beşinci kuşak sefalosporinlerden Seftobiprol molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                    | 18 |
| Şekil 8: İmipenem molekül yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                       | 20 |
| Şekil 9: Meropenem molekül yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                      | 20 |
| Şekil 10: Ertapenem molekül yapısı .....                                                                                                                                                                                                                                     | 21 |
| Şekil 11: Doripenem molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                      | 21 |
| Şekil 12: Aztreonam molekül yapısı.....                                                                                                                                                                                                                                      | 22 |
| Şekil 13: Polimiksin B (üstte) ve Polimiksin E (Kolistin) (altta) moleküllerinin yapısı. Mavi daire içindeki amino asit grupları iki polikisitin arasındaki farktır. Polimiksin B molekülünde D-Phe bulunurken Polimiksin E (Kolistin) molekülünde D-Leu bulunmaktadır. .... | 43 |
| Şekil 14: 4' fosfat kafa grubuna 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A molekül yapısı. Lipid A yapısı kırmızı kutu, eklemlenen aminoarabinoz mavi daire, 1' ve 4' fosfat kafa grupları yeşil çember ile gösterilmiştir. ....             | 46 |

Şekil 15: 4' fosfat kafa grubuna fosfoetanolamin (PEtN) eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A molekül yapısı. Lipid A yapısı kırmızı kutu, eklenilen fosfoetanolamin mavi daire, 1' ve 4' fosfat kafa grupları yeşil çember ile gösterilmiştir. .... 48

Şekil 16: Hiçbir modifikasyon geçirmemiş Lipid A (solda) ve Pozisyon 2 açıl zincirine palmitat eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A. Eklenen palmitat grubu mavi dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir. .... 49



## RESİMLER LİSTESİ

- Resim 1: Isı bloğunda kaynatılan izolatların DNA'sının ekstraksiyon işlemi..... 58
- Resim 2: 95 V ve değişken akımda ampliconların jel elektroforezde (Bio RAD, ABD) yürütülmesi..... 60
- Resim 3: 19-30 nolu izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Soldan 1. kuyucuk DNA ladder (100 bp-1000 bp), 2. kuyucuk pozitif kontrol. OXA-48 (743 bp)..... 68
- Resim 4: OXA-51 (353 bp) agaroz jel elektroforezinde görüntüsü. Soldan 1. kuyucuk DNA ladder 2. kuyucuk *A. baumannii* ATCC 19606 pozitif kontrol, 6. kuyucuk negatif kontrol, diğer kuyucuklar çalışmadaki 1-17 nolu izolatlar ..... 69
- Resim 5: Üst soldan 1. Kuyucuk DNA ladder (100 bp-1000 bp), 2. Kuyucuk kolistin dirençli *E. coli* NTCC 13846 (*mcr-1* pozitif) (305 bp), 6. kuyucuk *mcr-1* negatif kontrol suşu ve diğer kuyucuklar 1-30 nolu KDKp izolatlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü. .... 70

## GRAFİKLER LİSTESİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Grafik 1: SMD yöntemine göre kolistin MİK değerlerindeki izolat sayılarının dağılımı. ....                                                                                                                                                                                                                                  | 66 |
| Grafik 2 : KDKp 33 izolatın PCR yöntemleri ile saptanan karbapenemazlar genlerinin yüzde dağılımı.....                                                                                                                                                                                                                      | 68 |
| Grafik 3: <i>mcr-1</i> geninin yüzde (%) dağılımı.....                                                                                                                                                                                                                                                                      | 70 |
| Grafik 4: a) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin duyarlı izolatların kolistin MİK değerlerine göre duyarlılık yüzdeleri. b) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin dirençli izolatların kolistin MİK değerlerine göre duyarlılık yüzdeleri. .... | 73 |
| Grafik 5: a) SMD yöntemi kolistin duyarlılıkları yüzde oranları b) Otomatize sistem kolistin duyarlılıkları yüzde oranları.....                                                                                                                                                                                             | 74 |
| Grafik 6: <i>mcr-1</i> geni ile kolistin MİK değeri bulguları arasındaki kıyaslamaya ait bulgular .....                                                                                                                                                                                                                     | 75 |
| Grafik 7 a) <i>mcr-1</i> geni pozitif izolatlar arasında kolistin MİK değerine göre duyarlılık yüzdeleri. b) <i>mcr-1</i> geni negatif izolatlar arasında kolistin MİK değerine göre duyarlılık yüzdeleri. ....                                                                                                             | 75 |
| Grafik 8: BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistem kolistin duyarlılık ile <i>mcr-1</i> geni bulgularının sayısal kıyaslamasına ait bulgular .....                                                                                                                                                         | 76 |
| Grafik 9: BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin duyarlı izolatların <i>mcr-1</i> pozitif ve negatif yüzdeleri. b) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin dirençli izolatların kolistin <i>mcr-1</i> pozitif ve negatif yüzdeleri .....             | 77 |
| Grafik 10: Karbapenemazların <i>mcr-1</i> pozitiflik bulguları .....                                                                                                                                                                                                                                                        | 78 |

## 1. ÖZETLER

### ***Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenem ve Kolistin Direnç Mekanizmalarının Moleküler Olarak Araştırılması**

**Öğrencinin Adı ve Soyadı:** Neslihan GENİŞEL

**Danışmanı:** Prof. Dr. Kadri GÜL

**Anabilim Dalı:** Tıbbi Mikrobiyoloji

#### 1.1. Özet

**Amaç:** Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKp) enfeksiyonları azalan tedavi seçeneklerinden dolayı endişe verici sağlık sorunudur. Klinik izolatlarda karbapenem direncine en sık enzim aracılı mekanizmalar neden olur. Kolistin, KDKp'nin neden olduğu enfeksiyonlara karşı son çare tedavilerinden biri olarak kabul edilir. Bu çalışmanın amacı, kan örneklerindeki KDKp'lerin karbapenemaz (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-55, OXA-58, KPC, NDM-1, VIM, IMP) genlerini değerlendirmek ve *mcr-1* geninin varlığını araştırmaktır.

**Gereç ve Yöntem:** Şubat 2020-Haziran 2020 tarihleri arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri YBÜ'nden bakteriyoloji laboratuvarına gönderilen kan örneklerinden izole edilen 33 adet KDKp izolatı çalışma kapsamına alındı. İzolatların antibiyotik duyarlılık testleri BD Phoenix 100 (BD, ABD) tarafından yapıldı. İzolatların karbapenem direnci Disk Difüzyon Test (DDT), kolistin duyarlılıkları Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) yöntemi ile fenotipik olarak tespit edildi. Tüm izolatlarda plazmid-aracılı *mcr-1* geni ve multiplex Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile karbapenemaz genleri araştırıldı.

**Bulgular:** DDT ile çalışılan KDKp izolatlarının hepsi (%100) ertapeneme dirençli (R) ; 9'u (%27,27) imipenem R, 23'ü (%69,7) meropenem R olarak tespit edildi. SMD yöntemine göre izolatların 20'si (%60,61) kolistine dirençliydi. PZR yöntemi ile izolatların %75,76 (n = 25)'sında *blaOXA-48*, %6,06 (n = 2) sında *blaNDM-1* ve %3,03 (n = 1)ünde *blaOXA-24* saptandı. İki (%6,06) izolatta hem *blaOXA-48* hem de *blaNDM-1* genleri; 16 (%48,48) izolatta ise *mcr-1* geni saptandı.

**Sonuç:** Kolistin direncinden sorumlu olduğu bilinen plazmid aracılı *mcr-1* genlerini taşıyan izolatların çok yüksek oranda bulunması kolistin direncinin moleküler

epidemiyolojik yöntemlerle takibe alınmasını gerektirmektedir. Sonuç olarak, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan KDKp'in karbapenem ve kolistin direnç mekanizmaları araştırılmalı, moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izlenmelidir. Her hastane otomatize sistem ve SMD yöntemini kıyaslayarak kendi kolistin duyarlılık sonuçları için yanlış duyarlılık oranlarını belirlemelidir.

**Anahtar Sözcükler:** *Klebsiella pneumoniae*, karbapenemaz, *blaOXA-48*, *mcr-1*, multipleks PZR, sıvı mikrodilüsyon.



## **Molecular Investigation of Carbapenem and Colistin Resistance Mechanisms In *Klebsiella pneumoniae* Isolates**

**Student's Surname and Name:** GENİŞEL Neslihan

**Adviser of Thesis:** GÜL Kadri, Professor

**Department:** Medical Microbiology

### **1.2. Abstract**

**Aim:** Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKp) infections are worrying health problems due to decreasing treatment options. Enzyme-mediated mechanisms are most frequently caused by carbapenem resistance in clinical isolates. Colistin is considered one of the last resort treatments for infections caused by CRKp. The aim of this study is to investigate the carbapenemase (OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-51, OXA-55, OXA-58, KPC, NDM-1, VIM, IMP) and *mcr-1* genes of the CRKps isolates.

**Material and Method:** A total of 33 CRKp isolates isolated from patient blood samples from the Dicle University Medical Faculty Hospital, ICUs between February 2020 and June 2020, were included in the study. Antibiotic susceptibility tests were performed by BD Phoenix 100 (BD, U.S.A.). Carbapenem resistance of isolates was determined phenotypically by Disk Diffusion Test (DDT), colistin susceptibility by Broth Microdilution (BMD) method. The presence of carbapenemase encoding genes including all CRKp isolates, *bla*OXA-23, *bla*OXA-24, *bla*OXA-48, *bla*OXA-51, *bla*OXA-55, *bla*OXA-58, *bla*KPC, *bla*NDM-1, *bla*VIM, *bla*IMP were investigated by multiplex PCR. CRKp isolates were tested for *mcr-1* gene by PCR.

**Results:** All CRKp isolates studied with DDT (100%) were resistant to ertapenem; 9 (27.27%) resistant to imipenem and 23 (69.70%) were resistant to meropenem. 20 (60.61%) of the isolates were found resistant to colistin. *bla*OXA-48 was found in 75.76% (n = 25) of isolates, *bla*NDM-1 in 6.06% (n = 2) and *bla*OXA-24 in 3.03% (n = 1). Both *bla*OXA-48 and *bla*NDM-1 genes were detected in two (6.06%) isolates and *mcr-1* gene in 16 (48.48%) isolates.

**Conclusion:** The very high rate of isolates carrying *mcr-1* genes necessitates monitoring of colistin resistance by molecular epidemiological methods. The

resistance mechanisms of CRKp should be investigated, monitored by molecular epidemiological methods. Each hospital should compare the automated system and the BMD method and determine the false susceptibility rates for their colistin susceptibility results.

**Key Words:** *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemase, *bla*OXA-48, *mcr-1*, multiplex PCR, broth microdilution.



## 2. GİRİŞ ve AMAÇ

Son zamanlarda Gram-negatif bakterilerde antibiyotik direnci halk sağlığı için kaygı verici boyuta gelmiştir. Çoklu İlaça Dirençli (ÇİD) bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları olan hastalar, etkili oral ilaçlar olmadığından hastane içi intravenöz tedaviye tabi tutulmak durumunda kalmaktadırlar. Ampirik antibiyotik tedavisindeki direnç; artan mortalite oranları, uzamış hastanede kalış süresi, tedavide güçlük ve daha yüksek maliyetlerle sonuçlanmaktadır.

Edwin Klebs tarafından 1875'te tarif edilen *K. pneumoniae*, Enterobacteriaceae familyasına ait Gram negatif bir bakteridir. Bu mikroorganizma, bireylerin sağlıklı mikrobiyomunun bir parçasıdır ve vücudun birçok bölümünde kolonizedir. Mikrobiyomun sağlıklı bir bileşeni olmasına rağmen, kritik hastalarda, yenidoğanlarda, bağışıklığı baskılanmış kişilerde veya hastane ortamlarında risk faktörü olanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Toplum ve hastane kaynaklı pnömoni, kan dolaşımı ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilen bir patojendir.

Çeşitli beta-laktam antibiyotiklere direnç ilk olarak 1983 yılında *K. pneumoniae*'de bulunmuştur ve bu direncin patojen tarafından üretilen genişletilmiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlardan (GSBL) kaynaklandığı gösterilmiştir (1). GSBL üreten *K. pneumoniae* prevalansı o zamandan bu yana büyük oranda artmış ve GSBL üretimi, enfeksiyonun etkin tedavisini engellemiştir (2). GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin sıklıkla kinolonlar da dahil olmak üzere çeşitli antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilmiştir. (3). Bu nedenle, karbapenemler GSBL'nin neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılmaya başlanmıştır.

KDKp ilk olarak 1993 yılında ortaya çıkmış ve KDKp prevalansı yıllar içerisinde küresel olarak artmaya devam etmektedir. KDKp neden olduğu enfeksiyonlar insan sağlığı için ciddi bir tehdit haline gelip ve mevcut sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle mortalite oranı oldukça yüksektir. Tüm dünyada hastanelerde KDKp salgınlığının artması nedeniyle direnç mekanizmalarının açığa kavuşması için birçok çalışma yapılmaktadır. Karbapenem direncine iki temel mekanizma aracılık etmektedir. İlki, KDKpler hücre duvarında azalmış membran geçirgenliği ile birlikte

AmpC sefalosporinaz gibi sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğine sahip  $\beta$ -laktamazlar üretebilir (4). İkinci mekanizma ise, karbapenemler dahil çoğu beta-laktam antibiyotiklerini hidrolize edebilen bir beta-laktamaz üretimi aracılık eder. Ambler sınıflandırmasına göre A sınıfı (*K. pneumoniae* karbapenemaz, KPC), B sınıfı veya metallo- $\beta$ -laktamazlar (MBL) (New Delhi metallo- $\beta$ -laktamazlar, NDM) ve D sınıfı oksasilineazlar (OXA-48 benzeri karbapenemazlardır (5). Bu koşullar altında kolistin, KDKp enfeksiyonları için son çare antibiyotikler haline gelmiştir (6).

Kolistin (polimiksin E) bir polipeptit bakterisidal ajandır ve klinik olarak mevcut olan polimiksin ajanlarının iki formundan (polimiksin B ve polimiksin E) biridir (7). Kolistin uzun süredir ciddi nefrotoksisite ve nörotoksisite sorunları nedeniyle yedek ajan olarak tutulmuştur ve daha az toksik antibiyotikler tercih edilmiştir (8). Florokinolonlar, aminoglikozitler ve ayrıca karbapenemler, monobaktam, sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinler de dahil olmak üzere tüm  $\beta$ -laktamlara dirençli Gram negatif patojenlerin prevalansındaki hızlı artış, kritik hastalarda kolistin geçerli bir terapötik seçenek olarak yeniden değerlendirilmesini sağlamıştır. KDKp enfeksiyonlarının tedavisi için kolistin kullanımındaki mevcut artışla birlikte, dünya çapında kolistin dirençleri rapor edilmektedir (9).

Önceleri kolistin direncinin kromozal nedenlerden kaynaklandığı bilinmekteydi. Ancak son yıllarda kolistin direncinden sorumlu mekanizmalardan birinin plazmid-aracılı mobilize kolistin direnci (*mcr*) geni olan *mcr-1* ve varyantları olduğu gösterilmiştir. *mcr-1* geni, Gram-negatif enfeksiyonları tedavi etmek için son çare antibiyotiklerden biri olan kolistine plazmid aracılı direnç kazandırmaktadır. Orijinal varyant olan *mcr-1*, bakteriyel bir türün farklı suşları arasında yatay geçişler yapabilme kabiliyetine sahiptir. Ayrıca, son zamanlarda *mcr* genleri yoluyla plazmid aracılı kolistin direncinin keşfedilmesi ve plazmid aracılı direnç belirleyicilerinin suşlar arasında hızla yayılma potansiyeli, kolistin son çare antibiyotik olarak gelecekteki kullanımına ilişkin endişelere yol açmaktadır. Özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda ÇİD izolatların neden olduğu enfeksiyonlara sıklıkla rastlanmaktadır. Bu izolatların kolistine de direnç kazanması halinde yoğun bakım hastalarında görülen bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonların tedavisi güçleşmekte, hastanede salgınlar kontrol altına tutulamakta ve mortalite artmaktadır (10).

Bu çalışmada amacımız Dicle Üniversitesi Hastanelerinde KDKp izolatlarında karbapenem direncinden sorumlu karbapenemazların ve kolistin direncine neden olan plazmid aracılı *mcr-1* geninin PCR moleküler yöntemi ile araştırılması; fenotipik olarak SMD yöntemi ile kolistin MİK değerilerinin tespiti sağlanarak otomatize sistemle kıyaslamak, uygun antimikrobiyal tedavisinin seçilmesini sağlamak klinisyenlere etkin antimikrobiyal tedavi seiminlerinde yardımcı olmak hedeflenmiştir.



### 3. GENEL BİLGİLER

#### 3.1. *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae*, Gram negatif, hareketsiz, kapsüllü, laktoz fermenter, fakültatif anaerobik, çubuk şeklinde bir bakteridir. Mac Conkey agarında geniş yayvan mukoidal, pembe-mor renkli laktoz pozitif koloni görünümüne sahiptirler.

Klinik ortamlarda, Enterobacteriaceae'nin *Klebsiella* cinsinin en önemli üyesidir. Ağız, deri ve bağırsakların normal florasında bulunsa da aspire edilirse insan ve hayvan akciğerlerinde, özellikle alveollerde, kanlı, kahverengimsi veya sarı renkli balgam gibi yıkıcı değişikliklere neden olabilmektedir. *K. pneumoniae* immünsüprese hastalarda fırsatçı enfeksiyonlarla sıklıkla ilişkili olan ve *E. coli*'den sonra ikinci sırada Gram negatif nozokomiyal sepsise neden olan patojendir (11).

*Klebsiella* cinsi Alman mikrobiyolog Edwin Klebs (1834-1913) tarafından adlandırılmıştır. Ayrıca, bu bakterinin özellikle kronik hastalıkları olan veya immünsüprese bireylerde görülen pnömoni için etiyolojik faktör olduğunu öne süren Carl Friedländer onuruna '*Friedländer'in basili*' olarak da bilinir. *K. pneumoniae*'nin neden olduğu toplum kaynaklı pnömoni *Friedländer'in basili* olarak da adlandırılmaktadır (12). Son yıllarda, *Klebsiella* türleri nozokomiyal enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan önemli patojenler haline gelmiştir (13).

*K. pneumoniae* tarafından en sık görülen nozokomiyal enfeksiyonlar; idrar yolu enfeksiyonları (sistit, piyelonefrit, böbrek ve perirenal apse), pnömoni (bronkopnömoni, lobar pnömoni, bronşit, ventilatöre bağlı pnömoni), cerrahi alan enfeksiyonları ve kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır (14). Bunların yanı sıra, *K. pneumoniae* diğer pulmoner (kronik obstrüktif akciğer hastalığının akut alevlenmesi, ampiyem), kalıcı tıbbi cihaz ile ilişkili (intravasküler kateter, üriner katater) intraabdominal (karaciğer apsesi, safra yolu enfeksiyonları, peritonit) ve merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarında (nöroşirürji sonrası menenjit, beyin apsesi) da rol oynayabilmektedir. Enfeksiyonlar sporadik vakalar veya bir salgının bir parçası olarak ortaya çıkabilir (15).

*K. pneumoniae*'nin hastane ortamında kolonizasyonunu kolaylaştıran ve enfeksiyonu tetikleyen risk faktörleri vardır. Vücutlarında invaziv bir cihazı olan hastalar için cihazın kontaminasyonu bir risktir. Özellikle yenidoğan cihazları, solunum destek cihazları ve idrar sondaları kullanan hastalar daha fazla risk altındadırlar. Ayrıca, antibiyotik kullanım geçmişi de *K. pneumoniae* ile hastane enfeksiyonu riskini artıran bir en önemli faktörlerden biridir (13).

Klebsiella bakterilerinin hastane dışındaki en yaygın tipik olarak bronkopnömoni ve aynı zamanda bronşit şeklinde olan pnömonidir. Bu hastalar akciğer apsesi, kavitasyon, ampiyem ve plevral adezyon geliştirme eğilimindedir. Antimikrobiyal tedavide bile ölüm oranı yaklaşık %50'dir. Klebsiella pnömonisi olan bireyler ateş, bulantı, taşikardi ve kusmaya sahip olmanın yanı sıra karakteristik bir balgam öksürme eğilimindedir. Klebsiella pnömonisi, alkolizm gibi altta yatan rahatsızlıkları olan insanları etkileme eğilimindedir (16).

Klebsiella enfeksiyonu bulaşı için direkt temas ile kişinin bakterilere maruz kalması gerekir. Örneğin, Klebsiella pnömonisi için solunum yoluna veya kan dolaşımı enfeksiyonuna neden olmak için kana girmelidir. Bakterilerin kana girişini takiben sepsis ve septik şok görülebilir. Sağlık hizmetleri ortamlarında, Klebsiella bakterileri kişiden kişiye temas yoluyla örneğin, hastadan hastaya sağlık personelinin veya diğer kişilerin kontamine elleri yoluyla veya daha az yaygın olarak çevresel kontaminasyon yoluyla yayılabilmektedir. Hastane ortamlarındaki hastalar ventilatörlere bağlı, intravenöz kateterleri bulunan veya yaraları olduğunda Klebsiella'ya maruz kalabilirler. Bu tıbbi araçlar ve koşullar Klebsiella'nın vücuda girmesine ve enfeksiyona neden olmasına izin verebilir. (17)

### **3.1.1. Virülans Faktörleri ve Patogenezi**

*K. pneumoniae* genellikle fırsatçı bir patojen olarak kabul edilir. Bununla birlikte, sağlıklı kişilerde ciddi hastalığa neden olabilir. Bu tür suşlar genellikle hipervirülan olarak adlandırılır.

Moleküler Koch'un postülatlarına göre *K. pneumoniae*'de birkaç virülans faktörü belirlenmiştir (18). *K. pneumoniae* suşlarının çoğunluğu tarafından üretilen

polisakkarit kapsül, bu türün ana virülans faktörlerinden biridir. Polimorfonükleer hücreler tarafından fagositoza müdahale eder ve serumun bakterisidal aktivitesine dirençte rol oynar (19, 20). Bugüne kadar en az 78 kapsüler serotip (K-serotipi) tanımlanmıştır (21). Farklı K-serotipleri, virülans derecesinde farklılık göstermektedir. K1 ve K2 serotip izolatlarının, K1 / K2 olmayan izolatlardan daha virulan olduğu gösterilmiştir (22).

Hipermukoviskozite, Doğu Asya'dan gelen hipervirulan suşlarda sıklıkla görülmektedir. Kapsüler polisakkaritten kaynaklanan ince lifler ağı olan ekzopolisakkarit ağının aşırı üretimi ile ilişkilidir (23). Hipermukoviskoz fenotipin *rmpA*, *magA* ve *cps* gibi çeşitli genlerle ilişkili olduğu gösterilmiştir (24).

LPS, Gram negatif bakterilerin önemli bir bileşenidir. Toll- benzeri reseptör 4'e bağlandıktan sonra çeşitli proinflamatuvar mediyatörlerin (sitokinler, kemokinler ve majör histokompatibilite kompleks reseptörleri) üretimini artırır. Bugüne kadar *K. pneumoniae*'de O1'in klinik izolatlar arasında en yaygın olduğu dokuz farklı O serogrup tespit edilmiştir (25).

Kompleman aracılı öldürmeye karşı direnç, sistemik bir enfeksiyonun gelişmesinde önemli rol oynayabilmektedir. Serum direncinden kısmen polisakkarit kapsülü, LPS ve dış zar proteinleri (OMP'ler) soeumlu tutulmaktadır (26, 27) .

*K. pneumoniae*'de tanımlanan ana adezyon faktörleri tip 1 ve tip 3 fimbriyalardır (28, 29). Tip 1 fimbria, *Enterobacteriaceae*'nin farklı türleri arasında yaygın olarak dağılmıştır ve *fim* geni tarafından kodlanmıştır. Konakçı hücrelerde ve hücre dışı matris bileşenlerinde mannoz içeren yapılara yapışma eğilimi vardır. *K. pneumoniae* tip 1 fimbria, *E. coli*'de tanımlananla aynı değildir, ancak yüksek derecede yapısal benzerlikler paylaşırlar. Tip 1 fimbria faz varyasyonu gösterir: Ekspresyon idrar yolu enfeksiyonu sırasında açılır ve gastrointestinal sistemde ve akciğer enfeksiyonu sırasında kapatılır. Tip 1 fimbria'nın murin idrar yolu enfeksiyon modelinde önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir. Tip 3 fimbria, *mrk* gen kümesi tarafından kodlanır ve biyofilm oluşumu ve solunum epiteline, endotele, idrar kesesi hücrelerine ve kollajen tip V'ye bağlanmada rol oynamaktadır. Kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında önemli bir kolonizasyon faktörü olarak tanımlanmıştır (30).

Endotrakeal tüpler, intravasküler ve idrar sondaları üzerinde biyofilm oluşumu bulaşıcı bir odak görevi görebilmektedir (31). Ayrıca çevresel yüzeylerdeki ve su dağıtım sistemlerinin içindeki biyofilm, hastanelerde bakterilerin kalıcılığına katkıda bulunabilmektedir (32). Biyofilm içinde konakçı savunma mekanizmalarının, antimikrobiyallerin ve dezenfektanların aktivitesi sınırlıdır (33). Ek olarak, genetik materyalin biyofilm içindeki farklı bakteri türleri arasında değişimini de mümkün kılmaktadır. Önemli bir rol oynayan tip 3 fimbria'nın yanı sıra, *K. pneumoniae*'nin biyofilm oluşumunda başka faktörlerin de olduğu düşünülmektedir (34-36).

Demirin kullanılabilirliğinin sınırlı olduğu kan dolaşımının ve konakçı dokusunun içinde, bakterilerin ferrik iyon alması çok önemlidir. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının patogeneğinde çeşitli demir alım sistemleri bulunmaktadır (20). Enterobaktin, *K. pneumoniae* izolatları arasında en yaygın olarak kullanılan siderofordur, ancak aktivitesi lipokalsin-2 ile bozulabilir (37). Salmokelin (enterobaktin'in glikozile edilmiş bir türevi) ve yersiniabaktin gibi diğer demir bağlayıcı moleküller, lipokalsin-2 ile bağlanmaya direnç gösterebilir (38). Pnömonide de önemli bir virülans belirleyicisi olduğu doğrulanmıştır (37). Siderofor aerobaktin, enterobaktin'den daha düşük demir afinitesine sahiptir, ancak daha stabildir ve daha iyi çözünürlüğe sahiptir (20). Murin intraperitoneal ve subkütan enfeksiyon modellerinde virülans faktörü olduğu gösterilmiştir. Hipervirülen *K. pneumoniae* izolatları, hipervirülen olmayan suşlardan kantitatif olarak çoğunlukla aerobaktin, daha fazla siderofor üretir (39). Ayrıca hipervirülen suşlarda Klebsiella Ferrik iyon Uptake sistemi (kfu) olarak adlandırılan yeni bir demir alım yolu tanımlanmıştır (40).

Hiçbir virülans belirleyici veya virülans özelliği, yüksek derecede virülen veya hipervirülen bir suş oluşturamaz, daha çok farklı faktörlerin eşzamanlı ifadesi, bir izolatın virülans potansiyelini tanımlamaktadır (40).

### **3.1.2. Tedavi ve Direnç Sorunu**

Klebsiella tedavisi kişinin sağlık durumuna, tıbbi geçmişine ve hastalığın şiddetine bağlı olarak aminoglikozidler ve sefalosporinler gibi antibiyotiklerle

yapılmaktaydı. 1970'li yıllarda bu ilaçlara karşı direnç gelişince geniş spektrumlu sefalosporinler tercih edilmeye başlandı (41).

Çeşitli  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç ilk olarak 1983 yılında *K. pneumoniae*'de bulunmuştur ve bu direncin patojen tarafından GSBL üretiminden kaynaklandığı gösterilmiştir (1). GSBL üreten *K. pneumoniae* prevalansı o zamandan bu yana büyük ölçüde artmış ve GSBL üretimi enfeksiyonun etkin yönetimini zorlaştırmıştır (2). GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin sıklıkla kinolonlar da dahil olmak üzere çeşitli diğer antibiyotiklere dirençli olduğu bildirilince tedavilerde başarısızlıklar ortaya çıkmıştır (3).

Karbapenemler  $\beta$ -laktam antibiyotik grubuna ait oldukları halde GSBL'nin neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılmaya başlanmıştır. Karbapenemler, AmpC  $\beta$ -laktamazlara ve GSBL'lere karşı olağanüstü bir stabilite sağladıkları için Gram negatif bakteriyel enfeksiyonlarında etkili bir tedavi tercihi olmuştur. Ancak, dünya genelinde karbapenem dirençli bakteri sayısındaki artış nedeniyle, KDKp izolatlar büyük bir problem haline gelmiştir. Klinik izolatlarda, karbapenem direncinin en çok enzim aracılı (karbapenemaz) mekanizmalardan kaynaklandığı görülmüştür. Plazmidler veya transpozonlar gibi olarak yatay transfer edilebilir genler tarafından kodlanan karbapenemazlar, diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle birlikte karbapenemleri etkisiz hale getirmiştir (42).

KDKp ilk olarak 1993 yılında rapor edilmiştir (43). KDKp prevalansı bu tarihten itibaren küresel olarak artmaya devam etmiştir. Mevcut sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle yüksek mortalite oranıylar KDKp kaynaklı enfeksiyonlar insan sağlığı için önemli bir tehdit haline gelmiştir (6). Bu koşullar altında, son çare antibiyotik olan polimiksinler (kolistin) toksisitelerine rağmen kliniklerde çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *K. pneumoniae* enfeksiyonları için tedavi seçeneği haline gelmiştir.

Kolistin (polimiksin E) bir polipeptit yapıda, bakterisidal etkili antimikrobiyal bir ajandır ve klinik olarak mevcut olan polimiksin ajanlarının iki formundan (polimiksin B ve polimiksin E) biridir. Kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum ticari olarak temin edilebilen formlardır. Kolistin sülfata hidrolize edilen bir ön ilaç olan, parenteral yoldan uygulanabilen kolistimetat sodyum bakterinin dış zardaki

lipopolisakkarit (LPS) molekülleri ile etkileşerek dış zarın bozulmasına yol açarak bakterisit etkisini gösterir (7).

Kolistin, ciddi nefrotoksisite ve nörotoksisite sorunları nedeniyle uzun yıllar kliniklerde yedek ajan olarak tutulmuş ve daha az toksik antibiyotik kullanımı tercih edilmiştir (8). Florokinolonlara, aminoglikozitlere ve ayrıca karbapenemler, monobaktam, sefalosporinler ve geniş spektrumlu penisilinler dahil olmak üzere tüm  $\beta$ -laktamlara dirençli olan ÇİD Gram-negatif patojenlerin prevalansındaki hızlı artış, kolistinin kritik hastalıklar için geçerli bir terapötik seçenek olarak yeniden değerlendirilmesine neden olmuştur (9). Fakat, özellikle bakteriyemi gibi ÇİD Gram negatif enfeksiyonlarının tedavisi için kolistin kullanımındaki mevcut artışla birlikte, dünya çapında kolistin dirençli *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas spp.* ve *Enterobacteriaceae* varlığı rapor edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* 'nın neden olduğu enfeksiyonlarda kolistine intrinsik dirençli suşların da olduğu bildirilmiştir (44).

*K. pneumoniae*'de kolistin direnci, Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika, Asya ve Güney Afrika dahil olmak üzere birçok bölgeden bildirilmiştir. Klinik olarak izole edilmiş *K. pneumoniae* suşlarında en yüksek toplam kolistin direnç oranı Yunanistan'da %10,5-20 arasında, ardından Güney Kore (%6,8), Singapur (%6,3) ve Kanada'da (% 2.9) bildirilmiştir (44). Kuzey Amerika, Avrupa, Latin Amerika ve Asya-Pasifik bölgesindeki farklı merkezleri içeren küresel SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programı'ndan (2006-09) elde edilen veriler, *K. pneumoniae*'deki genel kolistin direnç oranının %1,5 olduğunu ortaya koymuştur (45). Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü (WHO) polimiksinleri kritik öneme sahip en önemli öncelikli antimikrobiyallerden biri olarak sınıflandırmıştır (46).

Kolistin dirençli KDKp izolatlarının duyarlı izolatlara kıyasla antibiyotiklere karşı çok daha duyarsız olduğu ve enfeksiyonlarının da ölüm oranlarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir (46, 47). Bu durum da Kolistin dirençli KDKp'lerde kolistin direnç mekanizmalarının araştırılması gerekliliğini kaçınılmaz kılmıştır.

Gram negatiflerde kolistin direnci incelendiğinde, genellikle 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) ve fosfoetanolamin (pEtN) eklenmesi gibi lipid A modifikasyonlarının neden olduğu bulunmuştur. LPS'in yapısı, PmrAB ve PhoPQ iki

komponentli sistemlerin düzenlenmesinden sorumlu olan *mcrB* gen mutasyonları ile değişerek kolistin direncine neden olabilmektedir (48).

Bu mekanizmalara ek olarak, ilk plazmid aracılı kolistin direnç geni, *mcr-1*, Çin'deki *E. coli* ve *K. pneumoniae*'dan gelen bir IncI2 plazmidinde tanımlanmıştır (49). 2016'da başka bir plazmid aracılı kolistin direnç geni *mcr-2* de bulunmuştur (50). Ek olarak, *mcr-1* taşıyan plazmidler genellikle farklı tip ve türler dahil olmak üzere farklı konak bakterilerde bulunmuştur (51). Bu da türler arası *mcr-1* genlerinin yayılmasının dünyadaki mevcut antibiyotik direnç krizinin ciddi şekilde tırmanmasına yol açabileceğini öne sürmüşlerdir (50).

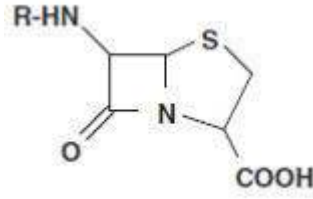
Bu nedenle, ÇİD *K. pneumoniae*'lerde karbapenem ve kolistin direnç mekanizmalarının aydınlatılması ve enfeksiyon epidemiyolojisinin anlaşılması antibiyotiğe dirençli izolatların yayılmasını engellemek, tedavilerindeki seçenekleri akılcı ilaç uygulamaları kapsamında belirlemek için ciddi öneme sahiptir.

### **3.2. Beta-laktam Grubu Antibiyotikler**

Tüm beta-laktam antibiyotiklerde ortak olan moleküler yapılarında  $\beta$ -laktam halkasıdır,  $\beta$ -laktam antibiyotikler genel olarak penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler olarak sınıflandırılmaktadır. Genellikle Penisilin Bağlayıcı Proteinlere (PBP) bağlanırlar ve bakteri hücre duvarının sentezini önlerler (52).

#### **3.2.1. Penisilinler**

Penisilinler, terapötik olarak kullanılan ilk  $\beta$ -laktam antibiyotikleridir. Bütün penisilinlerin moleküler ana iskelet yapısı, Şekil 1' de verilmiştir, bazık bir bisiklik yapı olan 6-aminopenisillanik asit veya 6-APA'dır. Fermantasyonla üretilen doğal penisilinler genellikle penisilinler G ve V karışımlarıydı. Bakteriler  $\beta$ -laktamları spesifik olarak inaktive eden penisilinaz adı verilen bir enzim grubu üretmek için evrim geçirene kadar penisilinler bakteriyel enfeksiyonlara karşı etkili bir şekilde kullanılmışlardır. Bu sorunun üstesinden gelmek için 6-APA kullanılarak yüzlerce sentetik ve yarı sentetik penisilin üretilmiştir (52).

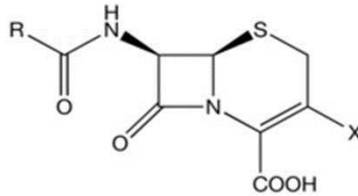


**Şekil 1:** Penisilin molekül yapısı

İlk sentetik molekül metisilin, benzen halkasının 2 've 6' pozisyonlarındaki doğal penisilinden farklıdır. Ardından Nafcillin, Quinacillin ve Ancillin üretildi. 5' pozisyonunda metil grubunun süstitüsüyonu ile oksasilin üretilmiştir. Benzer şekilde, 2 'pozisyonunda bir klor atomunun ve 2' ve 6 'pozisyonlarında iki flor atomunun girilmesiyle sırasıyla Kloksasilin ve Dikloksasilin üretilmiştir. Ayrıca, 6' pozisyonuna bir flor atomunun sokulması ile de Floksasilin üretilmiştir. Benzen halkasındaki bu değişiklikler moleküllerin stabilitesini arttırmasına rağmen, ana moleküle kıyasla güçlerini azaltmıştır. Ancak bakteriler bu antibiyotiklere yavaş yavaş direnç geliştirdi ve bu dirençli bakteriyel izolatları kontrol etmek için sefalosporinler verildi (52).

### 3.2.2. Sefalosporinler

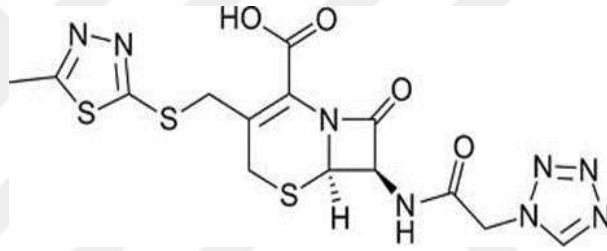
Sefalosporinler sefamisinler ile birlikte sefam olarak adlandırılır. Sefemler antimikrobiyal aktivite spektrumlarına göre güncel olarak beş kuşağa ayrılmışlardır. Herbir kuşak sefalosporin  $\beta$  -laktamazlara karşı stabilitesi, absorpsiyonları, metabolizmaları ve yan etkileri açısından farklılık göstermektedir. Şekil 2'de Sefalosporin genel molekül yapısı verilmiştir (52).



**Şekil 2:** Sefalosporin molekül genel yapısı

### 3.2.2.1. Birinci kuşak sefalosporinler

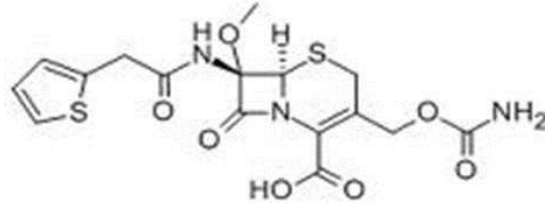
Birinci kuşak sefalosporinler, Enterococci ve metisiline dirençli Staphylococci hariç Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. *E. coli*, *Proteus*, *Klebsiella spp.* gibi Gram negatif basillere karşı orta derecede aktiviteye sahip ve *Bacteroides fragilis* hariç bütün anaerob koklar duyarlıdır. Birinci kuşak sefalosporinler; Sefalekssin, Sefradin, Sefadroksil Sefalotin, Sefapirin ve Sefazolin içerir. Şekil 3'te Sefazolin molekül yapısı verilmiştir. Üriner ve solunum yolu enfeksiyonlarının tedavisinde Sefalekssin, Sefradin, Sefadroksil kullanıldı ve cerrahi profilaksi için Sefazolin tercih edildi. Ne yazık ki, bu ilaçların hiçbiri merkezi sinir sistemine nüfuz etmediğinden, herhangi bir enfeksiyon için ilk tercih edilen ilaçlar değildir (52).



Şekil 3: Birinci kuşak sefalosporinlerden Sefazolin molekül yapısı

### 3.2.2.2. İkinci kuşak sefalosporinler

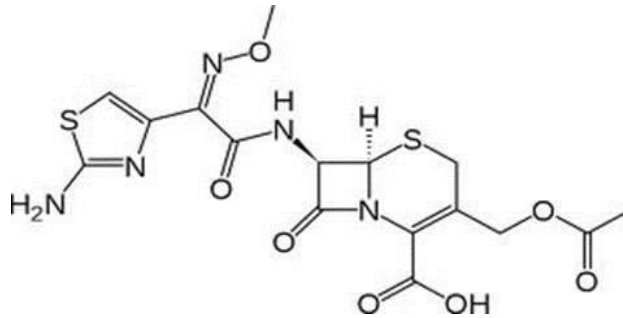
İkinci kuşak sefalosporinler heterojen bir antibiyotik grubundan oluşur: Sefamandol, sefonisid, seforanid ve sefuroksim. sefoksitin, molekül yapısı Şekil 4'te verilmiştir, Sefotetan ve Sefmetazol sefamisin olmasına rağmen, klinik değerleri nedeniyle bu sınıfa dâhil edildi. Bu antibiyotikler, birinci kuşak ilaçların kapsadığı mikroorganizmalara karşı aktifti; ayrıca *Klebsiella* ve *Proteus* da dâhil olmak üzere Gram-negatif basillere karşı genişletilmiş aktiviteye sahiptiler, ancak *Pseudomonas aeruginosa* ve *Haemophilus influenza*'ya karşı değillerdi. Sefoksitin ve Sefotetan, *B. fragilis*'e karşı aktifti ve anaerobik bakterilerin neden olduğu miks enfeksiyonları tedavi etmek için kullanıldı (53).



**Şekil 4:** İkinci kuşak sefalosporinlerden Sefoksitin molekül yapısı

### 3.2.2.3. Üçüncü kuşak sefalosporinler

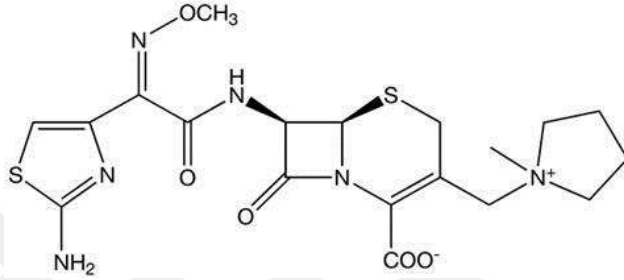
Üçüncü kuşak sefalosporinler, sefoperazon, sefotaksim, seftazidim, seftizoksim, seftriakson ve sefoksimi içerir. Gram-negatif bakterilere karşı genişletilmiş bir aktivite spektrumuna sahiptirler, ancak Gram-pozitif Enterokoklara karşı azalmış aktiviteye sahiptirler. Gram pozitif Enterokoklara karşı kullanıldığında genellikle süper enfeksiyonlar üretirler. Neyse ki, birkaç üçüncü kuşak ilaç merkezi sinir sistemine ulaşabilir ve ayrıca omurilik sıvısında yeterli konsantrasyonlarda görülebilir. Gram negatif basillerin neden olduğu menenjit durumlarında IV olarak uygulanır. Seftizoksim ve Sefotaksim, molekül yapısı Şekil 5 te verilmiştir. *B. fragilis* ve diğer anaeroblara karşı bir miktar aktivite sergiler. 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere benzer şekilde, 3. kuşak antibiyotikler bile *Enterococci*, *L. monocytogenes*, MRSA ve MRSE'ye karşı etkili değildir. İkinci kuşak ilaçların aksine, Sefoperazon ve Seftazidim *P. aeruginosa*'ya karşı etkilidir. Tüm üçüncü kuşak ilaçların her biri hastane kaynaklı Gram-negatif bakteriyemiye karşı etkili bir şekilde kullanılmıştır (52).



**Şekil 5:** Üçüncü kuşak sefalosporinlerden Sefotaksim molekül yapısı

#### 3.2.2.4. Dördüncü kuşak sefalosporinler

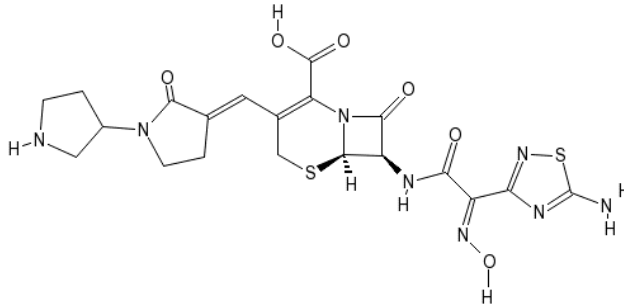
Sefepim, molekül yapısı Şekil 6'da verilmiştir ve Sefpirom bu kuşağa dahildir. Dördüncü kuşak sefalosporinler hakkında vurgulanması gereken üç önemli özellik şunlardır: Üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli *Enterobacter* ve *Citrobacter* türlerine karşı geliştirilmiş aktiviteye sahiptirler. Ayrıca, *Streptococci* ve metisilin duyarlı stafilokoklara karşı diğer üçüncü nesil bileşiklerden daha fazla aktiviteye sahiptirler. Seftazidim gibi Sefepim, *P. aeruginosa*'ya karşı aktiviteye sahiptir (6).



Şekil 6: Dördüncü kuşak sefalosporinlerden Sefepim molekül yapısı

#### 3.2.2.5. Beşinci kuşak sefalosporinler

Seftobiprol, molekül yapısı Şekil 7'de verilmiştir, Seftarolin, Sefotetan ve Sefoksitin bu kuşak içindedir. Beşinci kuşak sefalosporinler laboratuvarlarda özellikle ÇİD suşlarını kontrol etmek için sentezlenmiştir. Seftobiprol ve Seftarolin MRSA'ya karşı etkilidir. Seftarolin MRSA'ya karşı aktif olmasına rağmen, GSBL ve AmpC enzimleri tarafından kolayca hidrolize edilir. Bununla birlikte, seftarolin amikasin ile birlikte uygulandığında, GSBL ve AmpC hidrolizine direnç gösterebilir (52).



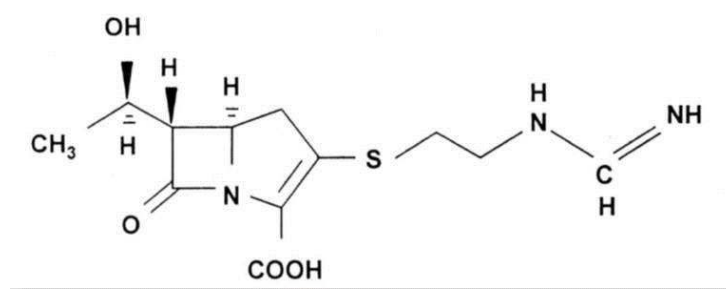
Şekil 7: Beşinci kuşak sefalosporinlerden Seftobiprol molekül yapısı

### 3.2.3. Karbapenemler

Karbapenemler en geniş spektrumlu  $\beta$ -laktam antibiyotiklerdir. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif GSBL ve AmpC üreten bakterilere karşı aktiftirler. Karbapenemlere karşı direnç geliştirirse yerini alacak başka bir  $\beta$ -laktam antibiyotik stokta yoktur.

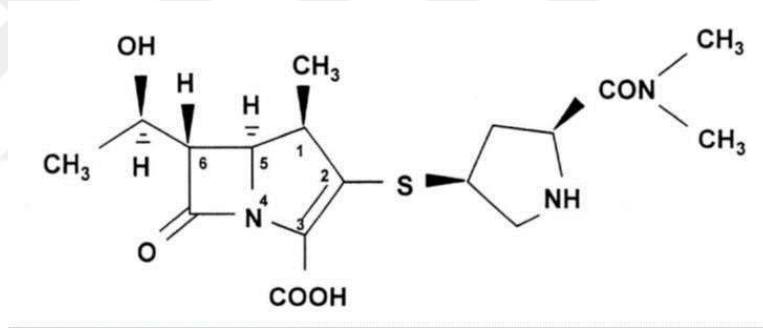
Tienamisin, günümüzde mevcut olan birkaç sentetik karbapenem kullanılarak geliştirilen ilk karbapenem olmuştur. Geleneksel Penisilinler ve Thienamisin arasındaki en büyük fark, hidroksietil yan zincirinin radikal olarak ayrılması; bu stereokimya, aktivitesi ve stabilitesi için anahtar bir faktördür. Thienamycin keşfedildikten kısa bir süre sonra, *Pseudomonas aeruginosa* gibi Gram-negatif bakterilere ve Streptokoklar ve *S. aureus* gibi Gram-pozitif bakterilere karşı daha fazla antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu için dünyadaki birçok araştırmacının dikkatini çekmiştir (54).

Ancak doğal olarak üretilen thienamycin miktarı çok düşük olduğu kadar son derece de kararsızdır. Ancak sefalosporine dirençli Gram negatif ve metisilin dirençli Gram pozitif bakterilerin ortaya çıkması gibi faktörler, artan stabiliteye sahip benzer türevlerin sentezini uyarmıştır. İlk sentetik olarak geliştirilmiş ve daha kararlı karbapenem, imipenemdir ve molekül yapısı Şekil 8'de verilmiştir. İmipenem aynı zamanda kompleks mikrobiyal enfeksiyonun neden olduğu enfeksiyonu tedavi etmek için kullanılan ilk karbapenemdir. Ancak, imipenem insan böbreğinde bulunan dehidropeptidaz I (DHP-I) tarafından deaktive edilmektedir. Bu durum, imipenemin silastatin ile birlikte uygulanmasıyla aşılmıştır. Silastatin antimikrobiyal aktiviteye katkıda bulunmaz, ancak imipenemin DHP-I tarafından bozulmasını önler. Bununla birlikte, daha sonra bu sorunun üstesinden gelmek için Meropenem, Biapenem, Ertapenem ve Doripenem gibi daha kararlı karbapenemler geliştirilmiştir (54).



**Şekil 8:** İmipenem molekül yapısı

1995 yılında imipenem benzeri geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip meropenem, molekül yapısı Şekil 9'da verilmiştir, tanımlanmıştır. Meropenem, nöbet yaratmamaya ilişkin terapötik bir avantaja sahiptir, bu nedenle menenjit gibi merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarını tedavi etmek için bile kullanılabilir. Meropenemdeki karbapenem kısmının 1-pozisyonundaki metil grubu onu yapısal olarak imipenemden farklı kılar, ayrıca renal DPH-1'e karşı direnç sağlar (55).

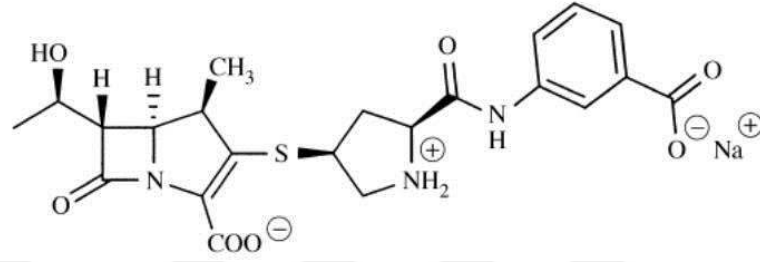


**Şekil 9:** Meropenem molekül yapısı

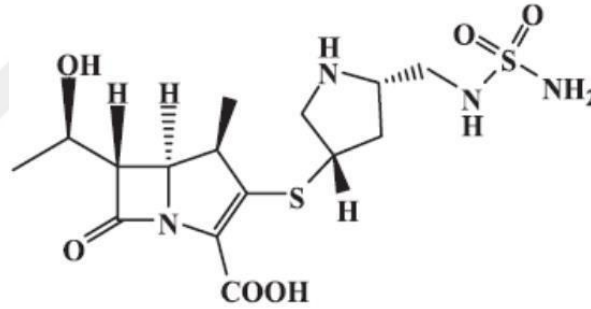
Hem imipenem hem de meropenem, GSBL ve AmpC üreten klinik izolatların neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Ancak imipenem sıklıkla çocuklara ve MSS bozukluğu olan yetişkinlere uygulandığında nöbet riski olduğundan, bakteriyel menenjit tedavisinde kullanılmamıştır. Meropenem'in böyle bir sorunu yoktur; MSS hastaları tarafından iyi tolere edilir ve bakteriyel menenjit tedavisinde kullanılır. İmipenem ve Meropenem birlikte ciddi bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde etkili bir şekilde kullanılmıştır (56).

Ertapenem, diğer karbapenem, özellikle GSBL enzimleri üreten bakterilerin neden olduğu toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için önerilmektedir.

Ertapenem molekül yapısı Şekil 10'de verilmiştir, miks aerobik / anaerobik polimikrobiyal enfeksiyonları kontrol etmek için uygulanmaktadır (57). Doripenem 1-β-metil karbapenem türevi olup, imipenem ve meropeneminkine benzer bir profile sahiptir, molekül yapısı Şekil 11'de verilmiştir. Doripenem; meropenem gibi renal DPH-1 tarafından parçalanmaz, silastatin ile birlikte verilmesi gerekmemektedir ve intravenöz olarak uygulanır (58).



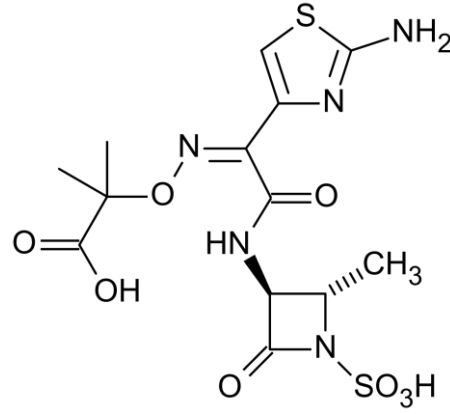
Şekil 10: Ertapenem molekül yapısı



Şekil 11: Doripenem molekül yapısı

#### 3.2.4. Monobaktamlar

Monobaktamlar ilk kez doğal yolla bakterilerden elde edilmiştir, ancak daha sonra sentetik olarak üretilmişlerdir. Aztreonam, molekül yapısı Şekil 12'de verilmiştir, tigemonam, nokardisin A ve tabtoksin sentetik monobaktamlar aerobik Gram-negatif bakterilere karşı etkilidir. Monobaktamlar, β-laktamaz inhibitörleri olarak kullanılır ve genellikle daha az antibakteriyel özelliğe sahiptirler (54).



**Şekil 12:** Aztreonam molekül yapısı

### 3.3. Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Bazı bakteriler bazı antibiyotiklere karşı doğal olarak dirence sahiplerdir buna “intrinsik direnç” bazıları ise antibiyotiklere karşı sonradan direnç kazanırlar buna da “kazanılmış direnç” denilmektedir.

#### 3.3.1. İntrinsik direnç

Hücre duvarı biyosentezini inhibe etmek için penisilin önce hücre duvarına yaklaşmalıdır. Gram-pozitif bakterilerin hücre duvarı, ilacın ilk önce dış zardan taşınması gereken Gram-negatif bakterilerin hücre duvarından daha erişilebilirdir. Bununla birlikte, dış zar, iç zar kadar seçici bir bariyer değildir. Makrolidler gibi hidrofobik antibiyotikler dış zarın hidrofobik lipid iki tabakasından yayılabilirken,  $\beta$ -laktamlar gibi küçük hidrofilik antibiyotikler dış zarda bulunan porin kanallarından kolayca geçebilirler. Bununla birlikte, yüksek derecede seçici olmamakla birlikte, bazı bakterilerin dış zar porları pozitif yükleri tercih ederken, diğer bazı bakterilerde negatif yükleri tercih edebilirler. Penisilinde, nötr vücut pH'ında pKa 7,0'dan az olduğu için karboksilat anyonu olarak bulunacak bir karboksil grubu vardır. *E. coli*'deki OmpC porin, katyonların taşınması için bir tercihe sahiptir ve bu nedenle negatif yüklü  $\beta$ -laktamlar için, bir dış zara sahip olmayan Gram-pozitif bakterilerden daha az erişilebilirdir. Diğer yandan gonokoklar penisiline karşı daha duyarlıdır, çünkü diğer gram negatif bakterilerin aksine gonokokal porları anyonları tercih eder.

*P. aeruginosa*, membran  $\beta$ -laktamlara karşı oldukça dirençlidir, çünkü dış zarları enterik bakterilerde bulunan klasik porlardan yoksundur. Bütün bu durumlar intrinsik direnç olarak görülmektedir (47).

### **3.3.2. Kazanılmış direnç**

Bakterilerin  $\beta$ -laktamlara karşı direnç kazanmasının üç yolu vardır: (1) ilacın hücreye geçirgenliğini azaltarak, (2) ilaca bağlanma afinitesini azaltmak için hedef protein (PBP) içinde mutasyonlar geliştirerek ve (3) ilacı bozabilecek  $\beta$ -laktamaz enzimi için gen kazanımı (47).

#### **3.3.2.1. Azalmış geçirgenlik**

Penisilinin sitoplazmik zarı geçmesi gerekmez, çünkü ilacın hedefi olan hücre duvarı sitoplazmik zarın dışında bulunur. Hücre duvarının kendisi geçirgenlik bariyeri olarak hareket etmez. Böylece ilacın hedefi olan transpeptidaz enzimine (penisilin bağlayıcı protein) gram pozitif bakterilerde kolayca erişilebilir. Bu nedenle, gram-pozitif bakteriler için, penisiline direnç, geçirgenliği azaltarak veya hücre içi birikimin önlenmesiyle meydana gelemez. Gram negatif bakterilerde dış zar, ilaç için bir bariyer görevi görür. İlaç dış zarda bulunan porlardan geçer. Por kanalları proteinler tarafından oluşturulduğundan, protein dizisinde geliştirilen nokta mutasyonları kanalın boyutunu veya yükünü değiştirebilir ve böylece ilacın geçirgenliğini azaltabilir.

#### **3.3.2.2. PBP'lerde mutasyonlar**

Penisilinin hedefi, PBP olarak da bilinen transpeptidaz enzimidir. Antibiyotik direnci, ilacın hedefindeki hedefe zayıf bir şekilde bağlanacak şekilde bir değişiklikten kaynaklanabilir. Bu değişikliklerin birçoğu, hedef enzimleri kodlayan genlerde bir nokta mutasyonu sonucu ortaya çıktığı için, bu ilaçlara direnç,  $10^6$  ile  $10^7$  hücrede 1 kadar spontan olarak ortaya çıkabilir. Devamlı seçim ile protein içinde birden fazla mutasyon olabilir ve bu da daha fazla direnç sağlar (59).

### 3.4. Beta -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

Antibiyotiklere sürekli maruziyetten dolayı zaman içerisinde bakteriler antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiler. Çoklu antibiyotiklere ve yatay gen transferine sürekli maruz kalma, ÇİD bakteriyel izolatları ile sonuçlanmıştır. Bu ÇİD suşları  $\beta$  laktam antibiyotiklere genellikle dört temel mekanizma ile direnir: (a) PBPlerin aktif bölgelerindeki değişimler, (b) Dış Membran Proteinleri (OMP) ekspresyonunda azalma, (3) Efflux pompaları, (d)  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin üretimi.

Dört mekanizmanın hepsinden  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin üretimi, klinik açıdan en yaygın ve önemli direnç mekanizmasıdır. Bu,  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin üretiminden sorumlu  $\beta$ -laktamaz genlerinin yatay gen transferinden kaynaklanabilir (60).

#### 3.4.1. Beta-laktamazlar

$\beta$  laktamaz, kendisini  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin ölümcül etkisinden korumak için bakteriler tarafından üretilen hidrolitik enzimlerdir.  $\beta$ -laktamaz spesifik olarak  $\beta$ -laktam halkasını hedefler ve halkadaki bağı kırarak antibiyotiği inaktif hale getirir. Aktivite profillerine bağlı olarak,  $\beta$ -laktamazlar dört tipte gruplandırılmıştır: Penisilinazlar, penisilinleri etkisiz hale getirir, ancak sefalosporinler, aztreonam veya karbapenemleri etkili değildirler. Sefalosporinazlar sefalosporinleri ve aminopenisilinleri etkisiz hale getirir, ancak diğer penisilinler, aztreonam ve karbapenemleri etkilemez. GSBL, karbapenemler hariç tüm  $\beta$ -laktamları etkisiz hale getirir. Karbapenemazlar, diğer  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin yanı sıra karbapenemi de inaktive eder (41).

$\beta$ -laktamaz enzimlerini kategorize etmek için iki önemli sınıflandırma şeması daha vardır: biri, aktif bölgelerindeki amino asit sekansına dayanarak A ile D arasındaki enzimlerini sınıflandıran Ambler sınıflandırmasıdır. Bir diğeri, substrat ve inhibitör profiline göre 1 ile 4 arasındaki enzimleri gruplayan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasıdır. Ambler sınıflandırması ayrıca  $\beta$ -laktamazları serin sınıf enzimlerine ve metallo-enzimlere bölen moleküler sınıflandırma olarak da bilinir. Serin sınıfı enzimleri, aktif bölgelerinde serin gerektiren A, C ve D sınıfı enzimleri içerir. Metallo enzimleri, substratlarını hidrolize etmek için aktif bölgelerinde en az

bir çinko iyonu gerektiren B sınıfı enzimlerdir. Jacoby sınıflandırması, enzimleri gruplamak amacıyla substrat ve inhibitör profillerini dikkate alan fonksiyonel sınıflandırma olarak da bilinir.

$\beta$ -laktamazlar çoğunlukla protein sekanslarına dayanarak, daha az sıklıkla fonksiyonel açıklama ile tarif edilir. Bu nedenle hem yapısal hem de fonksiyonel bilgiyi açıklayan bir dizi kriter aşağıda tartışılmıştır, ancak burada fonksiyonel sınıflandırma ayrıntılı olarak açıklanmış ve eşdeğer moleküler sınıflandırması paralel olarak açıklanmıştır. Tablo 1’de yapısal ve fonksiyonel sınıflandırmaları mümkün olduğunca yakından tanımlamaktadır. Fonksiyonel sınıflandırmalarda enzimler,  $\beta$  - laktam antibiyotiklerini hidrolize etme yeteneklerine ve klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine duyarlılıklarına göre gruplandırıldı. Fonksiyonel grupların her birinin açıklaması aşağıdadır.

#### **3.4.1.1. Grup 1 Sefalosporinazlar**

Grup 1 enzimleri, birçok bakteri izolatının kromozomları üzerinde kodlanan moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır. Bu grup enzimler Sefalosporinler, sefamisinler ve monobaktam özellikle aztreonama karşı daha aktiftirler. Grup 1 enzimler, Benzilpenisilini hidroliz edemezler ve genellikle klavulanik asit tarafından inhibe edilemezler. Ancak bazı enzimler istisnai olarak sefoksitin üzerinde aktivite göstermez, klavulanat veya tazobaktam tarafından inhibisyona uğrayabilirler. *C. freundii*, *E. cloacae*, *S. marcescens* ve *P. aeruginosa* gibi bazı bakteriler genellikle düşük AmpC ekspresyonu gerçekleştirir, ancak amoksisilin, ampisilin, imipenem ve klavulanik aside maruz kalma durumunda hızla AmpC ekspresyonunu indüklerler. Plazmid aracılı grup 1 enzimleri arasında CMY, ACT, DHA, FOX, MIR ve diğerleri bulunur. Grup 1 enzimlerin bir varyantı olan 1e, seftazidim ve diğer oksimin-  $\beta$ -laktamlara karşı daha çok aktiviteye sahip olup bu varyant Extended-Spectrum AmpC (ESAC)  $\beta$ -laktamazlar olarak adlandırılır ve GC1, CMY-10, CMY-19, CMY-37 ve diğerlerini kapsar.

### 3.4.1.2. Grup 2 Serin $\beta$ -laktamazlar

Fonksiyonel grup 2 serin  $\beta$ -laktamaz moleküler sınıfları A ve D enzimleri içerir, bunlar esas olarak GSBL'lerden oluşan en büyük  $\beta$ -laktamaz grubudur. Alt grup 2a  $\beta$ -laktamazlar, genellikle *Staphylococci* ve *Enterococci* dahil Gram-pozitif koklar tarafından üretilen sınırlı hidrolitik aktivite spektrumuna sahiptir (52).

**Tablo 1:** Beta-laktamazların sınıflandırılması

| Bush-Jacoby grup (2009) | Bush-Jacoby-Medeiros grup (1995) | Ampler Sınıflandırması | Substratlar                                     | Enzimler                                             |
|-------------------------|----------------------------------|------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| 1                       | 1                                | C                      | Sefalosporinler                                 | <i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1 |
| 1e                      | NI                               | C                      | Sefalosporinler                                 | GC1, CMY-37                                          |
| 2a                      | 2a                               | A                      | Penisilinler                                    | PC1                                                  |
| 2b                      | 2b                               | A                      | Penisilinler, ilk kuşak sefalosporinler         | TEM-1, TEM-2, SHV-1                                  |
| 2be                     | 2be                              | A                      | Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar | TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1                 |
| 2br                     | 2br                              | A                      | Penisilinler                                    | TEM-30, SHV-10                                       |
| 2ber                    | NI                               | A                      | Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar | TEM-50                                               |
| 2c                      | 2c                               | A                      | Karbenisilin                                    | PSE-1, CARB-3                                        |
| 2ce                     | NI                               | A                      | Karbenisilin, sefepim                           | RTG-4                                                |

Bu enzimler, benzilpenisilin ve diğer birçok penisilin türevlerini hidrolize ettiklerinden, ancak sefalosporinlere, karbapenemlere veya monobaktamlara karşı çok az veya daha az aktivite gösterdikleri için penisilinaz olarak da adlandırılır. Bu enzimlerin çoğu klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilir ve kromozomal olarak kodlanır, ancak bazı stafilokokal penisilinazlar plazmidlerde kodlanır.

Alt grup 2b  $\beta$ -laktamazların hidrolize penisilinlerin yanı sıra, sefaloridin ve sefalotin gibi ilk kuşak sefalosporinleri kolayca hidrolize ederler. Ayrıca, bu enzimler klavulanik asit ve tazobaktam tarafından kuvvetle inhibe edilir. Bunlar, 1970'lerde ve 1980'lerin başında tanımlanan plazmid aracılı  $\beta$ -laktamaz TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerini içerir (61). Alt grup 2be çoğunlukla sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi bir veya daha fazla oksimino- $\beta$ -laktamları hidrolize eden GSBL'ler içerir. Ayrıca, alt grup 2b  $\beta$ -laktamazların penisilinlerine ve sefalosporinlerine karşı aktivitelerini de korurlar. Alt grup 2be üyelerinin çoğu silinmiş veya alt tabaka spektrumlarını genişleten TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 varyantı eklenmiştir. CTX-M enzimleri adı olarak sefotaksimi hidrolize eder ve tazobaktam tarafından klavulanik asitten daha iyi inhibe edilir (62). Ek olarak, TEM, SHV veya CTX-M enzimleri ile ilgisi olmayan BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2, PER ve VEB buraya dahil edilmiştir. Genel alt grupta, enzimler klavulanik asit tarafından inhibisyona duyarlıdır (63).

#### **3.4.1.3. Beta-laktamaz inhibitörleri**

$\beta$ -laktam antibiyotikleri çeşitli bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılır ve şimdiye kadar sayısız hayat kurtarmıştır.  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri kombinasyonları,  $\beta$ -laktamaz üreten bakteri izolatlarının neden olduğu enfeksiyonları kontrol altında tutmak için kullanılır. Bu inhibitörler, yapısal olarak  $\beta$ -laktam antibiyotiklere benzer olsa da tek başına uygulandığında zayıf antibakteriyel aktiviteye sahiptir. İlginç bir şekilde,  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle birlikte,  $\beta$ -laktamazlara geri dönüşümsüz bir şekilde bağlanır ve  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin aktivitesini geri kazandırır. İnhibitörler,  $\beta$ -laktamaz enzimine bağlanarak aktif antibiyotiği inaktivasyondan korur. Halihazırda mevcut olan  $\beta$  laktamaz inhibitörleri

GSBL ve Sınıf C  $\beta$  laktamazlara karşı aktif olmasına rağmen, karbapenemaz enzimlerini kontrol etmek için etkili inhibitörler henüz tanımlanmamıştır (63).

Klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam ve avibaktam, metallo- $\beta$ -laktamazları değil, sadece serin  $\beta$ -laktamazları inhibe eder. Bugüne kadar metallo- $\beta$ -laktamazların bilinen bir klinik inhibitörü yoktur. Bununla birlikte, birkaç metallo- $\beta$ -laktamaz inhibitörü araştırılmaktadır. *Bacteroides fragilis*'deki karbapenem direnci, antibiyotiği hidrolize eden bir metallo- $\beta$ -laktamaz salgılanmasından kaynaklanır. Bifenil tetrazoller, enzim yapısının taranması ve moleküler modellenmesi yoluyla tanımlanan metallo-beta-laktamazın kompetitif güçlü inhibitörlerinin yapısal bir sınıfıdır. Bileşiğin, metallo- $\beta$ -laktamazı in vitro olarak inhibe ettiği ve imipenem-dirençli *B. fragilis*'in dirençli olanların duyarlıya dönüştürdüğü gösterilmiştir (63).

#### **3.4.2. Genişletilmiş-Spektrumlu $\beta$ -Laktamazlar (GSBL)**

GSBL'ler  $\beta$ -laktamazlardır, çoğu  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç sağlayan ancak klavulanik asit tarafından inhibe edilen enzimlerdir. Bu enzimler sefalosporinler, penisilinler ve sefamisinler gibi üçüncü nesil antibiyotikleri hidrolize edebilir, ancak karbapenemleri edemezler. Tanımlanan ilk GSBL enzimi, 1960'ların başında TEM-1'dir. Tanımlanmasından birkaç yıl sonra, birçok farklı cinsde yaygın olarak bulundu. Bu yeni GSBL enzimi ile mücadele etmek için seftazidim ve sefotaksim gibi genişletilmiş spektrumlu sefalosporinler geliştirilmiştir. Buna karşılık, son derece gelişmiş genişletilmiş spektrum dirençli TEM ve yeni GSBL enzimleri (SHV, OXA ve CTX-M) bakteriler tarafından üretildi. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporine direnen bakteriler tarafından üretilen bu enzim grubu bütün olarak GSBL enzimleri olarak adlandırıldı (63).

### **3.5. Karbapenemler**

#### **3.5.1. Karbapenem Antimikrobiyalleri**

Karbapenemler, GSBL üreten bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlarda etkinliği kanıtlanmış bakterisidal  $\beta$ -laktam antimikrobiyallerdir. Enterobacteriaceae grubunda sefalosporinlere karşı artan direnç sonucunda tüm dünyada kullanılan

imipenem, meropenem, doripenem, ertapenem, panipenem ve biapenem gibi karbapenem antimikrobikalleri vardır (41).

### **3.5.2. Karbapenemlerin Etki Mekanizması ve Yapı-Etki İlişkileri**

Karbapenemler, yapısal olarak penisilinler ile ilişkili olan  $\beta$ -laktam antimikrobiyal ailesinin potent üyeleridir. Karbapenemlerin etkisi öncelikle bakteri hücre duvarına penetrasyon ve ardından PBP'ler olarak bilinen enzimlere bağlanarak başlar(64, 65). PBP'lerin ana inhibe edici serisi, Ia, Ib, 2 ve 3'tür ve sonuçta meydana gelen ölümcül etki, hücre duvarı içinde bakterilerin öldürülmesine yol açan bir otolitik enzim inhibitörünün inaktivasyonudur (60, 66). Daha önce yapılan bir çalışmada PBP2 ve PBP3 inhibisyonunun Gram-negatif basilllerde sferik hücreler ve filamentöz yapılar oluşturduğu bildirilmiştir (67).

Mevcut anlayış, bakteri hücre duvarı sentezi sırasında karbapenemlerin ana enzim hedefi olarak transpeptidaz inhibisyonunu tarif etmektedir. Transpeptidasyon boyunca, karboksipeptidaz ve transpeptidaz enzimlerinden oluşan PBP'ler tarafından bir kovalent bağ oluşur, karbapenemler peptidoglikan biyosentezi sırasında peptit çapraz bağlama aktivitelerini önler. Letal etkilerin, bakteri hücreesindeki otolitik etki ile hücre ölümüne yol açtığı düşünülmektedir (68). Hücre duvarının canlılığı; PBP'ler bastırıldığında etkilenir, glikan iskeleti otoliz nedeniyle zayıflar ve hücre Gram-negatif bakterilerde ozmotik basınçla yok edilir (69).

Genel olarak karbapenemler konsantrasyondan bağımsız letal etkisi nedeniyle invaziv veya yaşamı tehdit eden enfeksiyonların tedavisinde diğer antimikrobikallere göre daha çok tercih edilir (70, 71). Bunlar Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilere ve anaeroblar da dahil olmak üzere etki ederek geniş spektrumlu bir aktivite gösterirler. Özellikle meropenem, doripenem, panipenem ve ertapenem gibi pirolidin türevleri olan karbapenemler siklikamin türleri arasında daha geniş bir aktivite spektrumuna sahiptirler. İstisnai olarak, siklikamin grubunda da biapenem olan panipenem, Gram-negatif bakteri suşlarına karşı marjinal etkinliğe sahiptir. İmipenem / silastatin ve meropenem; komplike karın içi enfeksiyonlar, cilt ve cilt yapısı enfeksiyonları, toplum kökenli pnömoni, nozokomiyal pnömoni, komplike idrar yolu enfeksiyonları, menenjit (sadece meropenem) ve febril nötropeni gibi çeşitli enfeksiyonların

tedavisinde etkinliğini ortaya koyan karşılaştırmalı klinik çalışmalarda incelenmiştir (65).

Karbapenemler arasında kıyaslama yapılırsa doripenem, çoğu  $\beta$  -laktamazın hidrolizine karşı oldukça kararludur (72, 73), ve aynı zamanda, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için daha düşük MİK değerlerine sahip olduğu bildirilmektedir (74, 75). Bulgular, doripenemin imipeneme göre daha az duyarlı ve karbapenemaz hidrolizinde (2 ile 150 kat) de çok daha yavaş olduğunu göstermektedir (76). *P. aeruginosa*'ya karşı ertapenem etkinliği, meropenem veya imipenem ile karşılaştırıldığında nispeten kısıtlıdır. Çalışmalar ayrıca *A. baumannii*'nin meropeneme kıyasla imipenem veya doripeneme karşı duyarlılığının arttığını doğrulamaktadır (77).

### 3.5.3. Karbapenem Kullanımı ve Yan Etkileri

Direnç mekanizması olarak karbapenemazlar, hasta sonuçlarındaki başarıları arttırmak için karbapenemlerin kombinasyon tedavisinde etkili kullanımı bağlamında gözden geçirilmiştir (78). Bakteri tarafından üretilen birçok enzim  $\beta$ -laktam antimikrobiyallerini degradasyona uğratar. Bu enzimler  $\beta$ -laktamazlar olarak bilinmektedir. Ancak,  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile beraber kombine edilen karbapenem ajanlarının bakteri tarafından degrade edilmesi zor bulunmuştur. Bu şekilde ilk kullanılan imipenem, silastatin ile kombine edilmiştir. Silastatin imipenemin renal metabolizmasını önleyerek yarı ömrünü uzatmaktadır (79). İmipenem, meropenem ve doripenem in vivo yarılanma ömürleri yaklaşık 1 saat, ertapenem yarılanma ömürleri yaklaşık 4 saat olup, günde bir kez uygulama için uygundur. İmipenem, diğer karbapenemlerle karşılaştırıldığında doza bağımlı gastrointestinal yan etkileri nedeniyle dikkat çekmektedir (65). Ertapenem, *Pseudomonas* türlerine ve diğer non-fermentatif Gram negatif bakterilere karşı en düşük aktiviteye sahip karbapenemdir. Şu anda klinikte karbapenemlerin farklı türleri (doripenem, imipenem ve meropenem) antipsödomonal ajan olarak kullanılmaktadır. Ertapenem, imipenem ve meropenem oral yoldan emilimi çok azdır ve parenteral uygulama ile etkinlik sağlanır. Son zamanlarda karbapenemler arasında ciddi enfeksiyonların tedavisi için doripenem önem taşımaktadır (71, 80).

Karbapenemler, sarılık ile hepatotoksositeye yol açan hepatik metabolizma etkilerine sahiptir, ancak nadir görülen bir tıbbi durumdur (65). Çoğu karbapenem, böbrek tübüllerinde bulunan dehidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimi tarafından bozunurlar ve bundan dolayı silastatin gibi bir DHP-1 inhibitörü ile birlikte verilmesi gerekir. Doripenem ve ertapenem de dahil olmak üzere karbapenem ajanlarının sonradan eklenen türevleri Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlara karşı stabil olduklarından  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine gereksinim bulunmamaktadır. Bu bileşikler PBP' ye bağlanmalarda farklılık gösterir, böylece farklı türlere karşı aktivite farklılıkları gösterirler. Bu, PBP3'ü ve fırsatçı patojen *P. aeruginosa*'yı inhibe edenler spesifik bir örnek olarak görülebilir.

#### **3.5.4. Karbapenem Direnci**

Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae (KRE) enfeksiyonları, tüm dünyada artan bir endişe olarak ortaya çıkmaktadır (81, 82). Karbapenem ajanları çok etkili antimikrobiyallerdir ve hastanelerde intravenöz olarak uygulanır, alerjik çapraz reaksiyon çok az veya hiçtir (83). Her karbapenem ajanının kendi işlevi vardır, bu da seçimini ciddi enfeksiyonlar için klinik uygulamada spesifik ve hassas kılar (84).

##### **3.5.4.1. Gram Negatif Basillerde İntrinsik Direnç**

Karbapenemlere direnç gelişimi, intrinsik veya sonradan kazanılmış direnç mekanizmalarından veya her ikisinden kaynaklanıyor olabilir. Hem kommensal hem de patojenler olmak üzere çok sayıda bakteri doğal olarak bazı antimikrobiyal ajan sınıflarına dirençli olma eğilimindedir. İntrinsik direnç olarak adlandırılan bu duyarsızlık tedavi sırasında ilaç seçimlerini komplike hale getirir veya kısıtlar. Bu da sonradan kazanılmış direncin artmasına da neden olabilir. Örneğin, Gram negatiflerde, hücre zarı porin kanallarını seçici olarak değiştirerek  $\beta$ -laktam ilaçlarının alımını azaltır. Dış zar geçirgenliğinin bu şekilde azaltılması  $\beta$ -laktamların hedeflerine ulaşmasını önler.

##### **3.5.4.2. Gram-Negatif Basillerde Kazanılmış Direnç**

Bakteriler, enzimatik inaktivasyon, hedef bölge mutasyonu ve efflux pompaları dahil olmak üzere birçok direnç mekanizması kazanmıştır. Bunlardan, inaktive edici

enzimlerin gelişimi ve ortaya çıkışı  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin kliniklere girişinin ardından tespit edilmiştir. Zamanla  $\beta$ -laktam hidrolize edici enzimler, penisilinazlarla başlayan aktivite spektrumlarını, ardından sefalosporinazlar, daha sonra GSBL'ler ve en son olarak MBL'lar ve diğer karbapenemazlar olarak genişletti. MBL'lar, ÇİD Gram negatif basillerin tedavisi için kullanılan karbapenemlerin (çoğunlukla son çare ilaçları olarak kabul edilir) faydasını büyük ölçüde etkilemiştir (52).

Enterobacteriaceae'de bulunan kazanılmış karbapenemazların çoğu plazmid aracılıdır ve bakteri izolatları arasında yayılmalarının birkaç yolu vardır. Ek olarak , son zamanlarda gözlemlenen karbapenem direncine neden olan başka önemli mekanizmalar da vardır. İlk olarak, hidrolize dirençli olan karbapenemler, GSBL enzimleri ile kombinasyon halinde plazmid AmpC'lerin varlığında yok edilebilir ve Gram negatif bakterileri karbapenem ajanlarına karşı duyarsız hale getirir (85). GSBL genleri mikroorganizmalar arasında transfer potansiyeline sahiptir. Buna karşılık, porinleri mutasyona uğramış veya ekspresyonları modüle edilmiş olan bu suşlar tipik olarak mobilizasyon potansiyeline sahip değildir, ancak hastanelerde lokal olarak çoğalırlar. Bu tip mekanizma Klebsiella, Enterobacter türleri ve *E. coli* ve diğer cinslerde bulunabilir. Karbapenemler arasında ertapenem en kötü etkilendir; izolatlar diğer karbapenemlere duyarlı olmaya devam edebilir. Çoğu durumda, ertapeneme duyarlılığın azalması büyük ölçüde AmpC / GSBL varlığının derecesine ve porinlerin defektlerine bağlıdır. Efflux pompalarının aşırı ekspresyonu ve OprD porin kaybı, özellikle imipenem olmak üzere *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinin en yaygın mekanizmasıdır. Diğer  $\beta$ -laktamlar bu mekanizmadan etkilenebilir. *P. aeruginosa*'da imipeneme kıyasla meropenem kullanıldığında efflux pompalarının aşırı ekspresyonu gerçekleşir. Hem kommensal hem de patojen bakterilerin amfipatik veya lipofilik maddeleri hücre içine ve dışına almak için kullandıkları efflux pompaları farklı mekanizmalara sahiptir. Bu mekanizmalar, imipenem ajanına karşı *E. aerogenes* ve Klebsiella türleri gibi mikroorganizmalarda da belirtilmiştir (86).

Genel olarak Gram negatif bakteriler hücre duvarı farklılıkları, azalmış dış zar geçirgenliği, efflux pompları ve çeşitli genişletilmiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazların (örneğin GSBL ve/veya AmpC sefalosporinaz) varlığı nedeniyle Gram pozitif

bakterilere kıyasla birçok antimikrobiyal ve kemoterapötik ajana karşı daha dirençlidirler. Bu direnç, geniş spesifikiteli ilaç-efflux pompaların varlığına dayandırılabilir (87, 88).  $\beta$ -laktam direnci ile ilişkili yapısal proteinler  $\beta$ -laktamazlar, PBPlar ve efflux pompa sistemleri de dahil olmak üzere alt gruplara ayrılmaktadır.

*Poole ve ark.* tarafından kapsamlı bir şekilde gözden geçirilen ilaç-efflux pompa sistemlerinin yapılarından biri de MexAB-OprM'dir (89). Bu üç komponentli bir pompa; iç RND transporter pompası MexB, dış membran porini OprM ve çözünü periplazmik MexA  $\beta$ -laktamlar ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri (örneğin klavulanik asit) gibi birçok sayıda antimikrobiyale karşı çok güçlü etki gösterirler. Bu 3 yollu efflux pompasının ve yapısal özelliklerinin anlaşılması *Eswaran ve ark.* tarafından derlenmiştir ve örnek olarak *E. coli* kullanarak her bir komponent incelenmiştir (90); iç membran pompası ve dış membran porin bileşenleri AcrB ve TolC sırasıyla 3.5 ve 2.1 Å rezolüsyon, *P. aeruginosa*'dan MexA periplazmik bileşenin yapısı 3.5 Å'dur.

Üçüncü olarak, *Acinetobacter* izolatlarında spesifik efflux pompası sistemlerine ek olarak porin kaybı karışımı gibi karbapenemaza özgü olmayan mekanizmalar bildirilmiştir. Oksasilin hidrolize edici (OXA) karbapenemazlar için yokluklarından daha zayıf tespit seviyeleri bulunmuştur (91).

Karbapenemazlar ÇİD klinik izolatları tarafından üretilen genişletilmiş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlardır ve karbapenemler dahil olmak üzere tüm beta laktam antibiyotiklerin tümünü hidrolize eder. Başlangıçta, karbapenemazlar tespit edildiğinde, türe özgü, kromozomal kodlanmış  $\beta$ -laktamazlar oldukları düşünülmüştür. Plazmid kodlu karbapenemaz belirlendikten kısa bir süre sonra, bu genlerin yayılması konusundaki tüm perspektif değişmiştir.

Karbapenemazlar, aktif bölge kompozisyonlarına göre üç tipte sınıflandırılabilir. İlk olarak, *K. pneumoniae* Karbapenemazları (KPC) ve aktif bölgelerinde serin amino asiti olan ve genellikle fenil boronik asit (PBA) tarafından inhibe edilen diğer enzimleri içeren A sınıfı enzimlerdir (91).

İkinci olarak, New Delhi Metallo  $\beta$  laktamazları (NDM) ve aktif bölgelerinde en az bir çinko molekülüne sahip olan ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) tarafından etkili bir şekilde inhibe edilen diğer enzimleri içeren B sınıfı enzimlerdir.

Son olarak, Oksasilinaz (OXA) enzimi içeren D sınıfı enzimler aktif bölgelerinde serin bulundurur, ancak PBA veya EDTA tarafından inhibe edilmezler (92, 93).

### 3.5.4.3. Karbapenemaz Enzimlerinin Moleküler Sınıflandırılması

Enterobacteriaceae'de Ambler sınıflarına göre A, B ve D  $\beta$  -laktamazlar olmak üzere üç  $\beta$ -laktamaz sınıfına ait çok çeşitli karbapenemazlar tanımlanmıştır: Bu sınıflar, nozokomiyal patojenler arasında en büyük klinik öneme sahiptir. Sınıf A, B ve D  $\beta$ -laktamazların hepsi aktif bölgelerinde bir serin kalıntısını paylaşırlar. Dördüncü sınıfın (Ambler Sınıf C) klinik rolü bilinmemesine rağmen karbapenemlere karşı geniş aktiviteye sahiptir (94, 95).

#### Sınıf A Karbapenemazlar

Bu sınıfta birçok enzim tanımlanmaktadır. NmcA (not metalloenzyme carbapenemase A), SME (Serratia marcescens enzyme), IMI-1 (Imipenem-hydrolysing-  $\beta$  lactamase), SFC-1 (Serratia fonticola carbapenemase-1) kromozomal olarak kodlanırlar. KPC (KPC-2-KPC-13), IMI (IMI-1-IMI-3), GES (Guiana extended spectrum) türevleri (GES-1-GES-20) plazmid aracılı olarak kodlananlar arasındadır.

Ama hepsi de aktif olarak karbapenemleri hidrolize ederler ve kısmi olarak klavulanik asit tarafından inhibe edilirler (82, 85). Bunlardan, KPC' ler en yaygın olanıdır ve keşfinden birkaç yıl sonra, dünya çapında yayılmıştır ve birçok Asya, Kuzey Amerika ve Avrupa ülkesinde ve Afrika'da salgınlara neden olmuştur. KPC üreticileri,  $\beta$ -laktamlara karşı ÇİD olarak evrilmiştir, böylece hastalarda KPC ile ilişkili enfeksiyonların tedavisi için terapötik seçenekleri sınırlanmıştır (96). *Perez ve ark.* tarafından yapılan derleme çalışmada KPC genlerinin şu an küresel olarak

mevcut 12 *blaKPC* varyantının olduğunu belirtmişlerdir (6). Bir çalışmada sınırlı terapötik seçeneklerin olduğu gösterilmektedir.

Farklı ülkelerden KPC üreten izolatlar kıyaslandığında plazmidlerin büyüklüğü, sayısı ve yapısındaki farklılıklar ve ilave  $\beta$ -laktamaz içerikleri multi-lokus bölgelerinde farklılara neden olup farklı KPC direnç klonların tüm dünyada yayılımı olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, *blaKPC* genlerinde tek bir genetik element (transpozon Tn4401) bulunmuştur (81).

#### Sınıf B Karbapenemazlar

Bu enzimler esas olarak karbapenemleri hidrolize etme yeteneğine sahip  $\beta$ -laktamaz sınıfındadır ancak  $Zn^{2+}$  ve diğer divalent katyonların şelatörü olan EDTA inhibisyonuna duyarlıdır. Hidroliz mekanizması  $\beta$ -laktam ilaçların enzim aktif bölgesindeki çinko iyonlarıyla etkileşimine bağlıdır. En yaygın metallo- $\beta$ -laktamaz aileleri içinde NDM-1 (New Delhi metallo- $\beta$ -laktamaz-1), IMP (Imipenem-resistant *Pseudomonas*) tipi karbapenemazlar, VIM (Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -laktamaz), GIM (German imipenemase) ve SIM (Seoul imipenemase). Bu enzimleri kodlayan genler genellikle çeşitli integron yapıları içinde bulunur ve gen kasetlerine dahil edilir (94, 97).

NDM karbapenemler dahil hemen hemen tüm  $\beta$ -laktam antibiyotiklerini etkili bir şekilde hidrolize eder. NDM'ler ilk olarak Asya ülkelerinde tanımlanan ancak daha sonra Avrupa ülkelerinde ve dünyanın diğer bölgelerinde bulunan güçlü B Sınıfı karbapenemazlardır. 2010 yılının ortalarında *blaNDM* geni, toplum kaynaklı bakteriler tarafından alınmış ve dünya çapında seyahat eden turistler aracılığıyla Avrupa ve ABD de dahil olmak üzere diğer ülkelere de ulaşmıştır, aynı suşlar Hindistan'daki çevresel örneklerde de bulunmuştur(98, 99). En azından, bu grupta 8 varyant tanımlanmıştır (100, 101).

Ayrıca, *blaNDM* geni başlangıçta *E. coli* ve *Klebsiella sp.*'de görülmüştür, ancak daha sonra *Acinetobacter sp.* dahil diğer enterobakteriyel ve enterobakteriyel olmayan türlerde de rapor edilmiştir. Ayrıca *blaNDM* geni çoğunlukla bir plazmidde, İnsersiyon Sekansları (IS) ve / veya Transpozonları (Tn) içeren eşsiz bir genetik

konumunda bulunmatadır. Ek olarak, *bla*NDM geninin genetik bağlamının analizi, iki ISAbal25 kopyasına sahip olan Transpozon Tn125'in *bla*NDM geninin yayılmasından sorumlu olabileceği hipotezine yol açmıştır. ISAbal25 insersiyon sekansı *Acinetobacter sp'*ye özgü olduğundan, *bla*NDM geninin *A. baumannii* kromozomundan kaynaklandığı varsayılmaktadır (102).

Şu ana kadar, 18 çeşit IMP tipi karbapenemaz tanımlanmıştır. İlk 1990'larda Japon'yada fark edilmiştir. Bu enzimlerin büyük bir çoğunluğu *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde olmasının yanı sıra Enterobacteriaceae ailesinde de incelenmiştir. IMP genleri 1997'de Avrupa'dan ilk rapor edildikten sonra Brezilya ve Kanada'da da bulunmuştur. Bu gen tipleri, Uzak Doğu'daki diğer ülkelere ve daha sonra ABD ve Avustralya'ya yavaşça yayılmıştır (94).

VIM genlerine Enterobacteriaceae'de nadiren rastlanmıştır, ancak en yaygın olarak *P. aeruginosa* ve *P. putida*'da görülmüştür. İlk olarak 1997'de Verona, İtalya'da izole edilmiş ve ağırlıklı olarak integron aracılı metallo- $\beta$ -laktamazlar olarak tanımlanmıştır. VIM ailesi 14 üyeden oluşmaktadır. VIM ve IMP aileleri, hangi plazmidleri taşıdıkları ve integron ile ilişkili oldukları açısından bazı benzerliklere sahiptir. VIM ailesi, iki aile arasında %10'a kadar, IMP için %15'e ve %70'e kadar amino asit dizisi çeşitliliğine sahiptir. Hem VIM hem de IMP monobaktamlar hariç bütün  $\beta$  -laktamları hidrolize ederler ve bütün  $\beta$  -laktam inhibitörlerine duyarlıdırlar (59).

#### Sınıf D Karbapenemazlar

Bu enzimler EDTA veya klavulanik asit tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilen serin- $\beta$ -laktamazlardır. Bu karbapenemazlar OXA enzim tipindedir ve karbapenemlere karşı zayıf bir aktiviteye sahiptir. Enzimler, öncelikle *A. baumannii*, *P. aeruginosa* gibi non-fermenter mikroorganizmalarda ve de Enterobacteriaceae ailesinin izolatlarında bulunmaktadır.

Karbapenemaz aktiviteli OXA  $\beta$ -laktamaz ilk kez Paton ve ark. tarafından tanımlanmıştır (103), ve bu enzim Edinburg, İskoçya'da bir hastadan 1985 yılında ÇİD *A. baumannii* izolatından saflaştırılmıştır. OXA karbapenemazlar ile ilgili en

büyük endişe, hızla mutasyona uğramaları ve aktivite spektrumlarını genişletme kabiliyetleridir. *Mathers ve ark.* Enterobacteriaceae ailesi arasında Sınıf D Karbapenemazların sık sık tespit edildiğini ve bunu dünya çapında bir tehdit ve büyük bir halk sağlığı sorunu haline geldiğini bildirmiştir (104).

2001 yılında, ilk kez Türkiye'de *K. pneumoniae*'de OXA-48 adında yeni bir karbapenem hidrolize edici D sınıfı  $\beta$ -laktamaz tespit edilmiştir. OXA-48  $\beta$ -laktamaz, penisilinler, sefalotin ve imipenem içeren ve daha az ölçüde sefotaksim, seftazidim, sefepim içeren dar spektrumlu bir hidroliz profiline sahipti. OXA-48, penisilinler ve imipenemi hidrolize eder, ancak geniş spektrumlu sefalosporinler ve aminoglikozidlere etki edemezler(75, 105). Şu an, OXA-48 *K. pneumoniae* izolatlarında Türkiye, Orta Doğu, Kuzey Afrika ve Avrupa'da en yaygın olan karbapenemazdır(106). OXA-48 tipi üreticiler, GSBL'lerle nokta mutant analogları nedeniyle tanımlanması en zor karbapenemaz üreticileri arasındadır; bu nedenle, gerçek yaygınlık oranlarını tahmin etmek zordur (82, 94).

Nozokomiyal olmayan OXA-24 tipi çevresel *Acinetobacter* türlerinde bulunurken, küresel olarak ortaya çıkan OXA-23 tipinin yayılması ABD ve Avrupa'da daha fazla görülmektedir. OXA-58 grubu, çeşitli salgınlarda dünya üzerinde önemli ölçüde tanımlanmıştır (107). *blaOXA-51*, *blaOXA-23*, *blaOXA-24* and *blaOXA-58* ÇİD *Acinetobacter*'lerde nozokomiyal salgınlarda sıklıkla bildirilmiştir. *A. baumannii*'lerdeki imipenem direncinden *blaOXA-51* ve *blaOXA-23* genlerinin esas olarak sorumlu olduğu düşünülmektedir (108)

### **3.5.5. Karbapenemaz Tespit Yöntemleri**

Karbapenemaz üreten klinik izolatların saptanması fenotipik ya da genotipik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Fenotipik deneyler genellikle karbapenemaz enziminin varlığını tespit ederken, genotipik deneyler karbapenemaz geninin varlığını tespit eder. Karbapenemaz üreten bakteri izolatlarını tanımlamak için çok sayıda test olmasına rağmen, burada çoğu klinik mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından sıklıkla kullanılan iyi belirlenmiş yöntemler tartışılmaktadır.

### 3.5.5.1. Fenotipik Yöntemler

Daha önce de belirtildiği gibi, tüm fenotipik deneyler karbapenemaz enzimlerinin varlığını tespit eder, ancak her tekniğin kendine özgü bir tespit yöntemi vardır. Metodolojideki fark, birkaç deneyi kolaylaştırırken diğerleri karmaşıktır. Ayrıca, deneyin maliyeti ve zaman gereksinimi, bunun yanında testin duyarlılığı ve özgüllüğü, testin kalitesini belirler.

#### Modifiye Hodge Test (MHT)

MHT normal klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bile yapılabilir ve EUCAST ve CLSI tarafından önerilmektedir (109). MHT’inde karbapenemaz enzimi ürettiğinden şüphelenilen bakteri izolatları (test suşu) ve kalite kontrol suşu *E. coli* ATCC 25922 aynı plak üzerinde büyümesine izin verildiğinde karakteristik bir desen oluştururlar. *E. coli* ATCC 25922 karbapenemaz enzimi üretmez ve karbapenem diskine duyarlıdır. Bu nedenle, test suşu karbapenemaz enzimleri ürettiğinde, karbapenem diski merkezde tutulduğu için kalite kontrol suşunun test suşu çizgisine doğru büyümesine izin verir. Bu, inkübasyondan sonra karakteristik bir yonca yaprağı benzeri çentik ile sonuçlanır.

#### Antimikrobiyaller ve İnhibitörler Mikrobiyolojik Testi (AIM)

MHT’ye benzer, AIM yönteminde de karbapenemaz üreten bakteri izolatlarını tespit etmek için kontrol suşu kullanılır. MHA plakları gece boyunca kontrol suşu *E. coli* ATCC 25922 ile inoküle edilir. Merkezde, imipenem diski (10 µg) tutulur ve bunun çevresinde, test suşundan 20µl free-cell ekstrakt içeren dört steril disk tutulur. 37°C’de bir gece inkübasyondan sonra, kontrol suşu *E. coli*’nin farklı diskler etrafındaki büyümesi analiz edilir. Test suşunun ekstraktını içeren disk çevresinde kontrol suşu büyümesinin mevcudiyeti karbapenemaz üreten suşlar olarak kabul edilir.

#### Kromojenik Tarama Besiyeri

Karbapenemaz üreten Enterobacteriaceae varlığını taramak için birkaç kromojenik besiyeri kullanılır. Kromojenik besiyeri, türe özgü enzimler için substrat

görevi gören moleküller olan kromojenler içerir. Bu agarlar üzerinde bakteri büyümesi oldukça, Enterobacteriaceae türüne spesifik renk kolonileri üretilir. Bu, özellikle bakteri türlerini tanımlamak için kullanılabilir. Bu besiyeri ile birlikte, karbapeneme dirençli suşların selektif olarak büyümesini sağlayan selektif antibiyotikler ve bakteri türlerinin net bir şekilde tanımlanmasına yardımcı olan kromojenik substratlar eklenmiştir. Brilliance CRE, ColorexKPC, chromID GSBL ve chromID Carba ticari olarak mevcut besiyerleri için birkaç örnektir (110).

#### Disk İnhibisyon Sinerji Testi

Sinerji testi, sınıfa özgü inhibitör tarafından karbapenemaz enziminin in vitro inhibisyonu prensibine dayanarak çalışır. A sınıfı karbapenemaz enzimleri, PBA kullanılarak inhibe edilir. B Sınıfı metallo-karbapenemaz enzimleri EDTA veya dipikolinik asit kullanılarak inhibe edilir. Karbapenemaz üreten bakteri izolatının sınıfını belirlemek için EDTA 750 µg veya PBA 600 µg yüklü karbapenem diski kullanılır. Karbapenem ve karbapenem emdirilmiş inhibitör diski arasındaki  $\leq 5$  mm zon büyüklüğündeki fark pozitif olarak kabul edilir ve sınıf tanımlaması için kullanılır (93).

#### Carba NP Test (CNPt)

CNPt, 2-3 saat içinde karbapenemaz üreten bakteri izolatlarını tespit eden hızlı bir biyokimyasal testtir. Bu test bakteri hücre lizatı tarafından imipenemin in vitro hidrolizi prensibine dayanmaktadır. Bakteri hücre lizatında karbapenemaz varlığı imipenemin hidrolize uğrayarak besiyerinde pH değişimine neden olur. Bu değişim indikatör (fenol kırmızısı gibi) kullanılarak tespit edilir. Besiyerindeki renk değişimi kırmızıdan sarıya dönüştüğünde pozitif kabul edilir. Bu test diğer testlere göre daha ucuz ve zaman kazandırır (111).

#### Spektrofotometrik Analiz

Işık kaynağını farklı dalga boyuna dönüştüren spektrofotometri, daha sonra dedektör kullanılarak numunenin transmisyonunu veya absorbansını kaydetmek için numuneden geçmelerini sağlar. Bu teknik, bakteriyel ham ekstrakt kullanarak

karbapenemaz aktivitesini tespit etmek için kullanılır. Ham ekstrakt (enzim) ve karbapenem genellikle imipenem (substrat) tamponlu çözeltiye ilave edilir ve substrat hidroliz oranı 299 nm civarında UV spektrumları kullanılarak ölçülür(112). Karbapenemaz testi olarak önerilse de meşakkatli olduğu için tanı laboratuvarlarında rutin olarak kullanılamaz (113). Ayrıca, birkaç kılavuz, bu yöntemi karbapenemaz sınıf ayırt etmede zaman alıcı ve daha az verimli olduğunu iddia ettikleri için rutin olarak önermezler (114).

## MALDI-TOF MS

MALDI iyonizasyon tekniği olarak kabul edilir ve en iyisidir antibiyotikler de dahil olmak üzere çeşitli sentetik bileşikleri ve biyopolimerleri analiz etmek için uygundur.

MALDI iyonizasyon işleminin anahtarı, UV ışığını emerek iyonlaşma sürecini kolaylaştırmak için küçük bir organik molekül olan bir matrisin kullanılmasıdır. Matris enerjiyi emebilir ve analit molekülünü gaz fazına patlatabilir. Spektrometrenin içinde analit vakum içine getirilir ve bir UV sonrası lazerle, genellikle 337 nm dalga uzunluğunda vurulur, lazer enerjisi, analit moleküllerinin gaz fazına da taşınan numune yüzeyinden enerji ile kesilen matris molekülü tarafından emilir.

Ablasyon işlemi sırasında analit molekülü iyonize olur. Şimdi gaz fazı analit iyonları üretildiğinden, kütleleri kütle spektrometrisi zamanına göre analiz edilebilir. En küçük iyon daha hızlı ve en büyük iyon hareketi daha yavaş ilerledikçe bu iyonların detektöre ulaşması değişir. TOF, iyon grubunun belirli bir mesafeyi kat etmesi için geçen süreyi algılar ve kaydeder. Bu zamandan ve elektrik alanının bilinen sabit kinetik enerjisinden, spektrometre tespit ettiği her iyonun “kütle / yük oranını” hesaplayabilir ve kaydedebilir. İyonize karbapenem ve onun bozunma ürünü kütle / yük oranı değişken olduğundan, karbapenem genellikle bakteriyel hücre lizati ile inkübe edilir ve MALDI TOF MS analizine tabi tutulur. Üretilen spektrumlardan, sonuçlar %100 özgüllük ve duyarlılıkla yorumlanabilir. Artık gelişmiş ülkelerdeki birçok klinik laboratuvarında yaygın bir analiz haline gelmiştir (115).

### 3.5.5.2. Moleküler Yöntemler

Moleküler analizler genellikle bakteriyel izolatlarda spesifik karbapenemaz genlerinin bulunup bulunmadığını belirler. Moleküler analizler, karbapenemaz geninin tanımlanması ve yeni geliştirilen yöntemlerin de değerlendirilmesi için referans standart yöntem olarak kullanılır. Tüm moleküler analizlerden PCR analizi, karbapenemaz genini saptamak için altın standart yöntem olarak kabul edilir. Bu, diğer moleküler analizlere nispeten daha hızlı ve uygun maliyetli olmasından kaynaklanabilir. Aşağıda kullanılan tekniklerin yanı sıra, Real-time (Gerçek Zamanlı) PCR, hibridizasyon ve mikroarray tabanlı moleküler teknikler de mevcuttur (82).

#### Multiplex PCR

PCR, karbapenemaz genlerinin varlığını ve sınıfını belirlemenin en hızlı yoludur (113). Multiplex PCR'in avantajı, aynı anda birkaç farklı DNA sekansını amplifiye etmesidir. Bu işlem, değişen boyuttaki ampikonları üretmek için tek bir reaksiyonda birden fazla primer kullanarak DNA'yı amplifiye eder. Her biri testte hedeflenen farklı sekanslara özgüdür. Tek bir test çalışmasında çoklu sekansları hedeflemenin avantajı, geleneksel PCR ile karşılaştırıldığında zaman ve reaktiflerden tasarruf etmesidir. Karbapenemaz genlerini saptamak için ilk multipleks PCR, 2007 yılında geliştirilmiştir, bu test beş farklı ailenin (VIM, IMP, SPM, GIM ve SIM) saptanması ve farklılaştırılması için tasarlanmıştır (116). Bu daha sonra birkaç araştırmacı tarafından daha fazla karbapenemaz genini hedefleyen daha fazla primer eklenerek geliştirilmiştir.

#### Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon (LAMP)

Normal PCR gibi LAMP, hedef geni amplifiye etmek için primerler ve DNA polimeraz kullanan bir izotermal gen amplifikasyon yöntemidir. Sonuç, bulanıklıkla veya etidyum bromür, kalsein ve SYBR Green gibi floresan boyalar kullanılarak görsel olarak tespit edilebilen çift sarmallı DNA'nın hızlı birikmesi ile elde edilir (117). LAMP kullanılarak karbapenemaz genleri doğrudan balgam, idrar ve dışkı örneklerinden saptandı (118).

## Yeni Nesil Dizileme (NGS)

NGS teknolojileri, uygun fiyatlı, hızlı ve uygun maliyetli tüm genom dizileme analizi sağlayarak klinik araştırmalarda devrim yaratmıştır (119). NGS teknolojileri bakteriyel klonu kullanmak yerine ya amplifikasyon yapmaksızın direkt sekanslar ya da sekanlama yapmadan önce izotermal amplifiye ederek sekanlama işlemine geçer. Çok kısa sürede sonuç vermesi ve düşük maliyetli olması avantajları arasındadır (120).

Karbapenemaz genleri, NGS ham okumalarının ve montajlı contiglerin RAST, CAR, ResFinder ve PGAAP gibi çevrimiçi sunucularla açıklanmasıyla tespit edilir (121).

NGS dizilimi kullanılarak tek-hücre DNA veya kültürülenemeyen bakterilerin DNA'sı, bakteri izolatları kültürlenmeden dizilenebilir. Bu nedenle NGS, kültürleme ve müteakip PCR amplifikasyonu ve sekanlamadan kaçınır. NGS tarafından tüm genom dizileme (WGS) ayrıca karbapenemaz genleri, sınıfı, genetik ortamları ve integronlar, transpozonlar ve plazmidler gibi mobil genetik elemanlar hakkında bilgi sağlar. Tüm bu bilgiler, birkaç zahmetli yoğun reaksiyonu önceden oluşturmak yerine, NGS kullanılarak tek bir reaksiyonda elde edilir (122, 123).

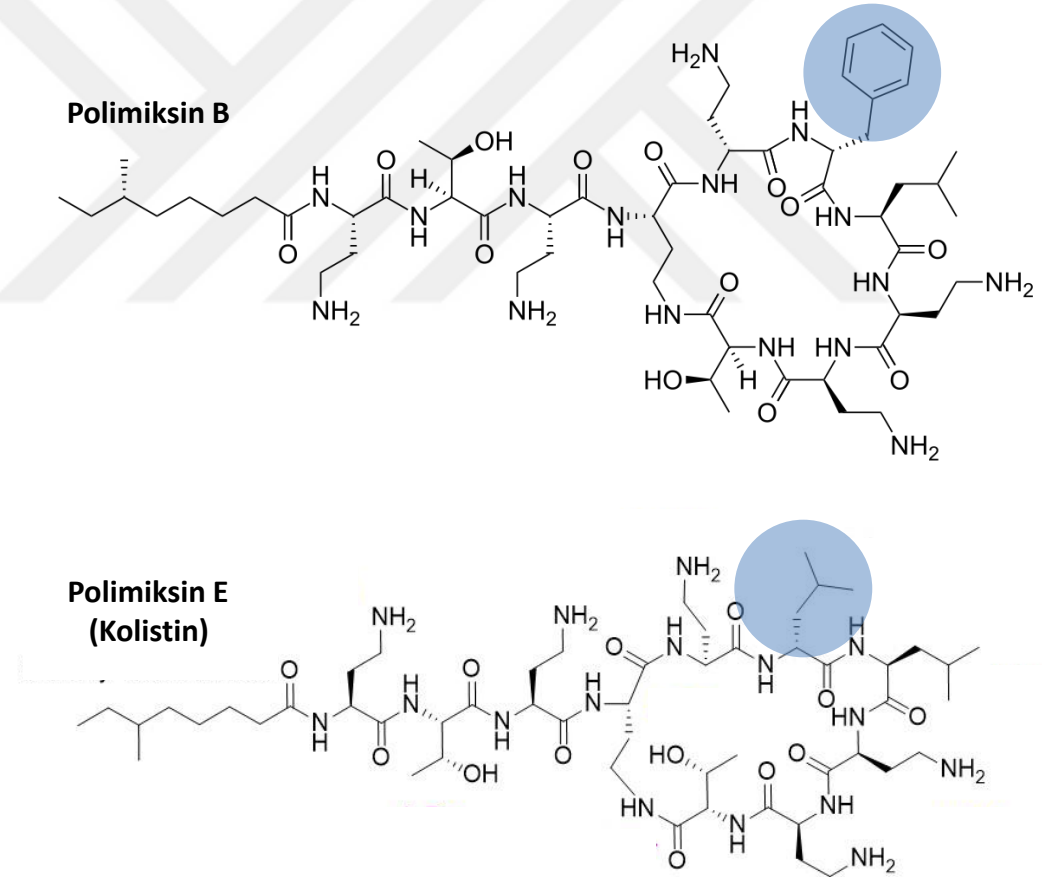
Ayrıca NGS sayesinde suş tipleri, tür kimliği ve bütün resistom ve ilgili karbapenem direnç mekanizmaları gibi çeşitli veriler aynı anda elde edilebilir. PCR ile tanımlanamayan yeni karbapenemaz genleri veya bir çalışmaya dahil edilmeyen primerlerin WGS ile kolayca tanımlanıp tanımlanması mümkündür (123, 124).

### 3.6. Polimiksinler

#### 3.6.1. Polimiksinlerin Yapısı ve Özellikleri

1947'de keşfedilen polimiksinler (125, 126), polimiksin A-E (127, 128) olmak üzere beş farklı bileşikten oluşan bir katyonik antimikrobiyal peptit (CAMP) sınıfıdır. *Paenibacillus polymyxa* tarafından üretilen, non-ribozomal peptitlerdir ve Gram-pozitif bakterilerin doğal bağışıklığında önemli bir rol oynarlar. Bu katyonik polipeptitler, Enterobacteriaceae türlerinin çoğu dahil olmak üzere Gram negatif

bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite sergiler (49). Polimiksinlerden klinikte sadece iki tanesi kullanılır: polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) molekül yapıları Şekil 13’de verilmiştir. Amino terminalde bir yağ asidi tarafından açile edilen bir tripeptit yan zincirine sahip bir siklik heptapeptit halkasından oluşan benzer bir dekapeptit yapısını paylaşırlar (129). 6. pozisyonda bir amino asit ile farklılık gösterirler, burada polimiksin B’deki D-fenilalanin, kolistindeki D-lösin ile değiştirilir. Polimiksinler ayrıca katyonik L- $\alpha$ - $\gamma$ -diamino-bütirik asit (L- $\alpha$ - $\gamma$ -Dab) kalıntıları içerir, bu da pH 7.4’te toplam +5 yüküyle polikasyonik bir yapıya neden olur (127). Ek olarak, iki hidrofobik alan, N-terminal yağ açil zinciri ve antibakteriyel aktivite için kritik olan amfipatiğe katkıda bulunan polimiksin B veya D-Leu6-L-Leu7 üzerinde D-Phe6-L-Leu7 segmenti içerir(130).



**Şekil 13:** Polimiksin B (üstte) ve Polimiksin E (Kolistin) (altta) moleküllerinin yapısı. Mavi daire içindeki amino asit grupları iki polikisitin arasındaki farktır. Polimiksin B molekülünde D-Phe bulunurken Polimiksin E (Kolistin) molekülünde D-Leu bulunmaktadır.

### 3.6.2. Polimiksinlerin Etki Mekanizması

Polimiksinlerin ilk hedefi dış membranın LPS bileşenidir (130). Polimiksin üzerindeki pozitif yüklü L-a- $\gamma$ -Dab kalıntıları üzerindeki serbest  $\gamma$ -aminlerinin protonlanması,  $Ca^{2+}$  ve  $Mg^{2+}$  iyonlarını değiştirerek lipid A üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarına elektrostatik çekim sağlar. Polimiksinin N-terminal yağ asil zinciri daha sonra dış membrana sokulur, bunu D-Phe6-L-Leu7 (polimiksin B) veya D-Leu6-L-Leu7 (kolistin) segmenti takip eder (129). Bu, dış zardaki bitişik lipid A yağlı açıl zincirlerinin paketlenmesini zayıflatır, bu da polimiksinin geçeceği stabilize olmayan alanları genişletmesine ve oluşturmaya neden olur (131, 132). Polimiksin daha sonra iç zarın fosfolipid çift tabakasına yerleştirilir ve membran bütünlüğüne ve hücre ölümüne yol açan yapısal bütünlüğünü bozar.

Her ne kadar membran lizis yolu polimiksinlerin ortak etki şekli olarak kabul edilse de vezikül-vezikül temas yolu olarak adlandırılan alternatif bir mekanizma önerilmiştir (133, 134). Dış zar içine polimiksin sokulduktan sonra, polimiksin iç ve dış zarın anyonik fosfolipidleri arasında lipid değişimini indükleyebileceğine inanılmaktadır. Veziküller arasındaki bu fosfolipid alışverişi fosfolipid kompozisyonunu bozar ve potansiyel olarak hücre lizisine yol açan bir ozmotik dengesizliğe neden olur. Diğer bir alternatif etki mekanizması, polimiksinlerin DNA, lipidler ve proteinlere zarar veren süperoksit ( $O_2^{\cdot-}$ ), hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve hidroksil radikallerinin ( $\cdot OH$ ) reaktif oksijen türlerinin oluşumunu indükleyerek hücre ölümüne neden olabileceği hidroksil radikal yoludur (135, 136).

### 3.6.3. Polimiksinlerin Klinik Kullanımı

Polimiksin B parenteral, intratekal olarak veya topikal olarak polimiksin B sülfat olarak uygulanabilirken, kolistin iki formda mevcuttur: oral veya topikal uygulama için sülfometillenmiş inaktif bir ön ilaç olan kolistin metansülfonat (CMS), sülfometillenmiş inaktif bir ön ilaçtır (137). Ek olarak hem polimiksin B hem de CMS, inhalasyon yoluyla uygulanabilir. Polimiksin B ile klinik deneyim, CMS'den daha az yerleşmiştir. Polimiksin kullanımı üzerine küresel bir araştırma, 56 ülkeden 284 katılımcıdan; CMS kullanan %50'ye kıyasla sadece %1,4'ü polimiksin B ile ilgili deneyim bildirmiştir (137). Birçok çalışma, yüksek doz, uzun süreli tedavi

rejimlerinde (138-140) kullanıldığında CMS'nin kabul edilebilir bir etkinliğe ve toksisiteye sahip olduğunu ve CMS ile tedavinin sona ermesinin ardından hastaların böbrek fonksiyonlarının normale döndüğünü göstermiştir (140). Gram negatif bakterilerde polimiksinlerin rifamisinler ve karbapenemler gibi diğer antibiyotiklerle kombinasyon tedavisinin in vitro sinerji gösterdiği bildirilmiştir, ancak polimiksin kombinasyon tedavisinin klinik etkinliği kanıtlanmamıştır (137). ÇİD *A. baumannii* kan dolaşımı enfeksiyonları olan 251 hastayı içeren bir çalışma, kolistin kombinasyon tedavisinin hasta mortalitesini önemli ölçüde azalttığını ve daha yüksek bakteriyolojik eradikasyon gösterdiğini, ancak in vivo polimiksin kombinasyon terapileri ile ilgili gelecekteki çalışmaların nihai bir karara varılması gerektiğini göstermiştir (141).

#### 3.6.4. Polimiksinlere Karşı Direnç

Polimiksinlerin kliniğe tekrar sokulmasıyla, birçok antibiyotiğe dirençli enfeksiyon etkili bir şekilde tedavi edilebilir. Genellikle son çare antibiyotikleri olarak adlandırılan bu güçlü antibiyotikler, diğer antibiyotik tedavilerine yanıt vermeyen *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* gibi ÇİD bakterilerini tedavi etmek için başarıyla kullanılmaktadır (142). Ancak, bugüne kadar keşfedilen birçok antibiyotikte olduğu gibi, polimiksinlere karşı direnç yakından takip edilmektedir. Son yıllarda, normalde bu antibiyotiklere duyarlı bakterilerde direnç dahil olmak üzere dünya çapında klinikte polimiksin direnci hakkında çok sayıda rapor sunulmuştur(142). Polimiksin B ve kolistin için mevcut CLSI ve EUCAST güncel kılavuzlarında antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri Tablo 2'de verilmiştir (143).

**Tablo 2:** Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nden (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi'nden (EUCAST) polimiksinler için mevcut antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri

| Mikroorganizma            | CLSI        |          | EUCAST      |          |
|---------------------------|-------------|----------|-------------|----------|
|                           | Polymyxin B | Kolistin | Polymyxin B | Kolistin |
| <i>Pseudomonas spp.</i>   | 8           | 8        | -           | 4        |
| <i>Acinetobacter spp.</i> | 4           | 4        | -           | 2        |
| <i>Enterobacteriaceae</i> | -           | -        | -           | 2        |

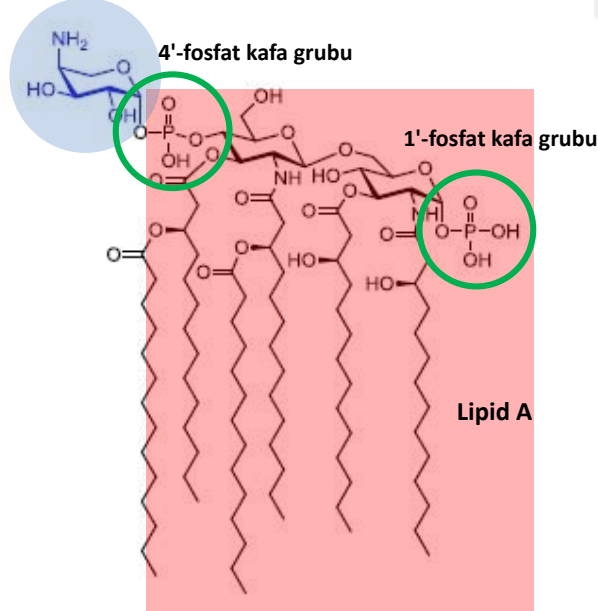
CLSI: Clinical and Laboratory Standard Institute; EUCAST: European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing

Polimiksinlere karşı direnç, en yaygın olarak iki komponentli düzenleyici sistem olan PhoP-PhoQ ve PmrA-PmrB'yi içeren çeşitli mekanizmalar yoluyla gerçekleşir ve bu da fosfoetanolamin veya 4-amino-4-deoksi-L-arabinozun lipid A'daki fosfat gruplarına eklenmesiyle LPS'nin modifikasyonuna neden olur (129, 142, 144). Ek olarak, lipid A'ya açıl zincirlerinin veya LPS biyosentezinden sorumlu genlerdeki mutasyonların eklenmesini içeren daha az yaygın modifikasyonlar da polimiksin direnci sağlaması ile karakterize edilmiştir (145-147).

#### 3.6.4.1. Aminoarabinoz transferazlar

ArnT gibi aminoarabinoz transferazlar, L-Ara4N-Lipid üreten lipid A'nın 1-veya 4'-fosfat kafa gruplarına pozitif yüklü bir 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) ilavesini katalize eder. Şekil 14'de, Lipid A molekülünün 4' fosfat kafasına aminoarabinoz bağlanmasıyla oluşan modifiye olmuş molekülün yapısı verilmiştir (148). L-Ara4N, lipid taşıyıcı undekaprenil fosfat tarafından sağlanır ve reaksiyon, iç zarın periplazmik yüzeyinde, lipid-lipid glikoziltransferaz ile katalize edilir.

4-amino-4-deoksi-L-arabinoz



**Şekil 14:** 4' fosfat kafa grubuna 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara4N) eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A molekül yapısı. Lipid A yapısı kırmızı kutu, eklenen aminoarabinoz mavi daire, 1' ve 4' fosfat kafa grupları yeşil çember ile gösterilmiştir.

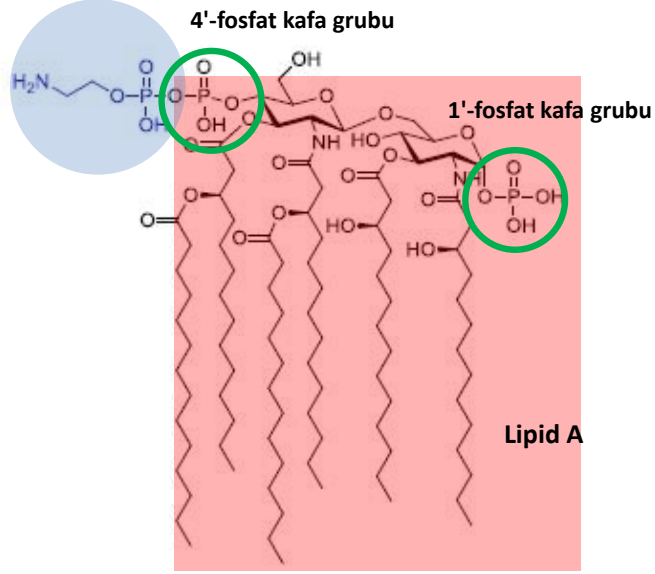
Bu pozitif yüklü fonksiyonel grubun eklenmesi, dış zarın negatif yükünü azaltır ve polimiksin biyoaktivitesinin en önemli yönü olduğuna inanılan polimiksin üzerindeki pozitif yüklü L-a- $\gamma$ -Dab tortularına elektrostatik çekimin azalmasına neden olur (130). L-Ara4N eklenmesi ayrıca LPS'nin stabilizasyon için iki değerlikli katyon çapraz köprülemeye bağımlılığını azaltır, kendi kendine teşvik edilen polimiksin alımını bloke eder (129, 130, 149).

Geleneksel olarak, L-Ara4N ilavesi gibi lipid A modifikasyonları, düşük pH veya  $Mg^{2+}$  gibi çevresel sinyallere ve CAMP'ların alt inhibitör konsantrasyonlarına yanıt veren iki komponentli düzenleyici sistem PhoP-PhoQ ve PmrA-PmrB içeren kromozomal olarak kodlanır (49, 129). Hücre stresi süresince, bir iç zar sensörü kinazı olan PhoQ, sitoplazmik regülatör PhoP'yi fosforile eder ve PmrA'yı fosforile eden PhoP ile aktive edilmiş PmrD proteini yoluyla PmrA-PmrB'nin aktivasyonuna yol açar (129, 130). Bu, ürünleri lipid A üzerindeki fosfat gruplarının kovalent modifikasyonu için gerekli olan PmrA ile aktive edilen genlerin transkripsiyonu ile sonuçlanır. Bu iki komponentli düzenleyici sistemlerde mutasyonlar *S. enterica*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da bildirilmiştir (150-153). Genellikle polimiksine dirençli fenotip üreten lipid A modifiye edici enzimlerin konstitütif ekspresyonu ile sonuçlanır (49, 129).

#### **3.6.4.2. Fosfoetanolamin transferazlar**

*mcr-1* gibi fosfoetanolamin (PEtN) transferazları, PEtN-Lipid A üreten lipid A'nın 1- veya 4'-fosfatına bir PEtN grubunun eklenmesini katalize eder (154, 155) Şekil 15'de, Lipid A molekülünün 4' fosfat kafasına fosfoetanolamine bağlanmasıyla oluşan modifiye olmuş molekülün yapısı verilmiştir. PEtN grubu, Gram negatif bakterilerin iç zarında yaygın olarak bulunan bir lipid olan fosfatidiletanolamin ile sağlanır ve reaksiyon, iç zarın periplazmik yüzeyi üzerinde, entegre bir membran proteini tarafından katalize edilir. Bu işlem için reaksiyon mekanizması henüz anlaşılamamıştır (156).

### Fosfoetanolamin (PEtN)

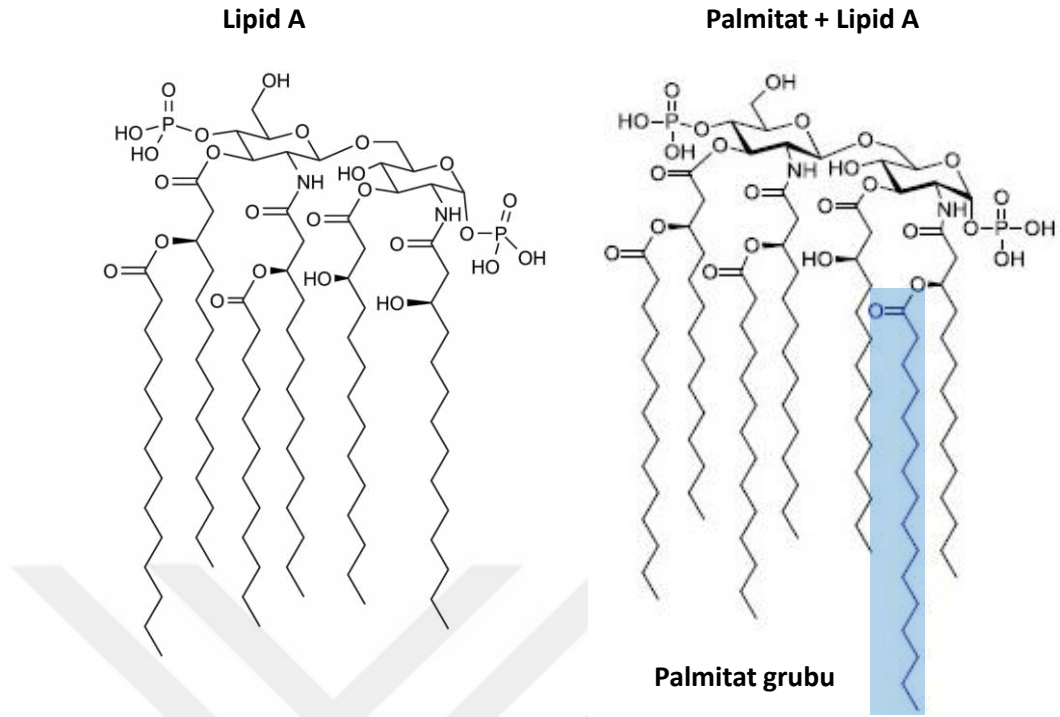


**Şekil 15:** 4' fosfat kafa grubuna fosfoetanolamin (PEtN) eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A molekül yapısı. Lipid A yapısı kırmızı kutu, eklenen fosfoetanolamin mavi daire, 1' ve 4' fosfat kafa grupları yeşil çember ile gösterilmiştir.

Bu grubun ilave edilmesinin, dış zarın negatif yükünü azalttığı ve polimiksin üzerindeki pozitif yüklü L-a- $\gamma$ -Dab kalıntılarının elektrostatik çekimini azalttığı da bildirilmektedir (130, 142). PEtN varlığı CAMP'lere ve düşük  $Mg^{2+}$  koşullarında LPS'nin çapraz köprüleme ve stabilize edilmesi için dış zarın iki değerlikli katyonlara bağımlılığını azaltır (157, 158). Aminoarabinoz transferazlarında olduğu gibi, PEtN'nin lipid A'ya eklenmesi, plazmidlerde bulunan mcr enzimleri gibi mobil kolistin direnci PEtN transferazları hariç, PhoP-PhoQ ve PmrA-PmrB iki komponentli düzenleyici sistemler tarafından kontrol edilen enzimler tarafından da gerçekleştirilir.

#### 3.6.4.3. Palmitoil transferazlar

PagP gibi palmitoil transferazlar, lipid A'nın 2 pozisyonunda açiloksiaçil bağlantısında bir palmitat grubunun eklenmesini katalize ederek hepta-açillenmiş lipid A üretir. Şekil 16'da modifiye olmamış ve palmitat eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A moleküllerin yapısı verilmiştir (146, 147). Palmitat, bir fosfoetanolamin açil donörü tarafından sağlanır ve reaksiyon, membrana bağlı bir palmitoil transferaz ile dış zarda katalize edilir (145).



**Şekil 16:** Hiçbir modifikasyon geçirmemiş Lipid A (solda) ve Pozisyon 2 açıl zincirine palmitat eklenmesiyle modifiye olmuş Lipid A. Eklenen palmitat grubu mavi dikdörtgen içerisinde gösterilmiştir.

Bu palmitoil (C16:0) grubunun lipid A'nın açıl zincirine eklenmesi, muhtemelen lipid iki tabakası içindeki zar akışkanlığını değiştiren ve CAMP'nin yerleştirilmesini ve daha fazla membran bozulmasını önleyen artan Van der Waals kuvvetlerinden dolayı bakterileri CAMP'lerden korur(145, 147). Aslında, PagP'nin ekspresyonuna, CAMP'lerin varlığında PhoP-PhoQ iki bileşenli düzenleyici sistem aracılık eder. *A. baumannii*'de, asetiltransferazlar LpxLAB ve LpxMAB'nin sırasıyla bir ve iki lauroil (C12:0) açıl zincirini, biyosentez sırasında lipid A'ya transfer ettiği, hepta-açıllanmış lipid A'yı oluşturan PagP'den bağımsız açılasyon zincirleri de gözlemlenmiştir (145).

#### 3.6.4.4. LPS mutantları

Nadir durumlarda, *A. baumannii*'nin LPS üretiminin tamamen kaybedilmesi nedeniyle polimiksinlere dirençli olabileceği bildirilmiştir. LPS'nin yokluğu, polimiksinlerin dış zarla etkileşimini önleyerek çok yüksek direnç profiline neden olur (159). Delesyonlar, nokta mutasyonları veya insersiyonlar, lipid A biyosentetik yolağındaki ilk üç genin, lpxA, lpxC, lpxD'nin bozulmasından sorumludur. Bununla

birlikte, bu mutantlar, zayıf virölansın yanı sıra, büyüme ve protein ekspresyonunda bozulma eğilimindedir.

### 3.6.5. *mcr-1*'in Keşfi

Kromozomal genlerdeki mutasyonlar, plazmid aracılı *mcr-1* geninin ilk kez bildirildiği 2015 yılına kadar kazanılmış kolistin direncinin bilinen tek mekanizmasıydı. *mcr-1*, lipid A parçasına pEtN ilavesini katalize ederek kolistine karşı daha az duyarlılık kazandıran bir pEtN transferazı kodlar(160). *mcr-1* geni, ilk olarak Çin kaynaklı *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında keşfedildi. Kesimdeki domuzlar arasında *mcr-1* taşıyan *E. coli* izolatları, domuz ve tavuktan perakende etler ve hastanelerde yatan hastalardan bulunurken, *mcr-1* taşıyan *K. pneumoniae* sadece yatan hastalardan izole edildi. *mcr-1*'in keşfi haberi, örnek koleksiyonlarında ve veritabanlarında dünya çapında taramalara yol açtı ve genin küresel olarak yayıldığı ve *S. typhimurium*, *S. paratyphi B* ve *S. sonnei* dahil olmak üzere birçok farklı Enterobacteriaceae türünde bulunduğu keşfedilmiştir (161). *mcr-1*'in keşfinden bu yana, diğer mcr genleri de bildirilmiştir. Bugüne kadar *mcr-2* ile *mcr-8*'i içerir, ancak *mcr-1* hala dünya çapında en yaygın olarak bildirilen kolistin direnç genidir. *mcr-1*'in yanı sıra, mcr genleri arasında sadece *mcr-3* ve *mcr-8* *K. pneumoniae*'de bildirilmiştir(161).

Daha önce, kromozomal olarak kodlanmış pEtN transferazlarının, *mcr-1* adı verilen bir pEtN transferaz enzimi tarafından katalize edilen plazmid aracılı polimiksin direnç mekanizmasının ortaya çıkışını belgeleyen PhoP-PhoQ ve PmrA-PmrB yolunun kontrolü altında olduğu gözlemlendi (49, 158).

*mcr-1*'in tanımlandığı plazmid, pHNSHP45, alıcı hücre başına  $10^{-1}$  ila  $10^{-3}$  hücre frekansında yüksek bir konjugasyon oranına sahiptir (49). Bu, Gram negatif mikroorganizmaların yabancı DNA'yı kolayca alabilmesi nedeniyle sorunludur ve en güçlü antibiyotik sınıflarından birine plazmid aracılı bir direnç mekanizması, polimiksin bir antibiyotik olarak gelecekteki kullanımı üzerinde muazzam bir etki yaratma potansiyeline sahiptir (158, 162). Ek olarak, *mcr-1* geni yatay gen transferinin *mcr-1*'in *E. coli* tarafından kazanılmasında rol oynamış olabileceğini gösteren bir insersiyon sekansını içermektedir (49).

Bugüne kadar, bir amino asit ile farklılık gösteren altı mcr-1 varyantı GenBank Veri tabanında bildirilmiş; biri KPC-3 üreten *K. pneumoniae*'de, dördü *E. coli*'de ve diğeri *S. enterica serovar typhimurium*'da (163).



## **4. GEREÇ ve YÖNTEM**

### **4.1. Örneklerin Toplanması**

Bu çalışmada, Şubat 2020- Haziran 2020 tarihleri arasında, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji laboratuvarına yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan alınan kan örneklerinden izole edilen 33 adet KDKp suşu dahil edildi. Her hastadan tek bir örnek çalışma kapsamına alındı.

(Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 06.02.2020 tarih ve 56 no'lu kararıyla etik kurallara uygun görülmüştür. Ek 10.1.).

İzolatlar, çalışmalar için yapılan canlandırma işlemine kadar, %16 gliserollü Triptik Soy Buyyon (Merck, Almanya) besiyeri içerisinde -20°C'de saklandı. Çalışmadan 1 gün önce derin dondurucudaki bakteri kültürleri oda ısısında bekletilerek çözümleri sağlandı. Ardından %5 KKA (RTA, Türkiye) ve EMB agar (RTA, Türkiye) besiyerlerine pasajlanarak, plaklar etüvde 35-37 °C de 18-24 saat inkübe edildi.

### **4.2. Suşların İdentifikasyonu**

#### **4.2.1. Kan Kültür**

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan aseptik şartlarda 8-10 cc kan alınarak kan kültür şişelerine bırakıldı ve otuz dakika içerisinde Dicle Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı Bakteriyoloji birimine gönderildi. BACTEC FX (Becton Dickinson, A.B.D) cihazında 5 gün süre ile inkübasyona bırakıldı. Üreme sinyali veren şişelerden %5 KKA, EMB agar ve Sabouraud Dextroz Agar (SDA) besiyerine subkültürleri yapılarak 35-37°C'de 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Besiyerlerinde üreyen bakterilerin tür identifikasyonu MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics, Almanya) cihazı kullanılarak yapıldı.

#### 4.2.2. MALDI-TOF MS

KKA ve EMB agar plaklarda üreyen kolonilerden, temiz bir kürdan ucu değdirilerek alınan örnekler çelik metal plaktaki hedef alanlara sürüldü. Oda ısısında kuruyan örneklerin üzerine sırasıyla %70'lik formik asit ve HCCA matriks solüsyonundan (Bruker Daltonics, Almanya) 1'er µl eklendi. Kimyasallar, bir önceki solüsyonun kuruması beklendikten sonra eklendi, ardından çelik metal plak, lazer atışlarına maruz bırakılmak üzere Microflex LT MALDI-TOF MS cihazına yerleştirildi. Hazırlanan örnekler yaklaşık 320-400 olacak şekilde lazer atışlarına maruz bırakıldı. Spektrometre ölçümleri sonrası veri tabanı ile karşılaştırma işlemi için Maldi Biotyper 3.0 yazılımı (Bruker Daltonics, Almanya) kullanıldı ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda  $\geq 2$  skora sahip olanlar cins ve tür seviyesinde kabul edilebilir sonuçlar olarak kabul edildi ve identifikasyon yapıldı.

#### 4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

##### 4.3.1. BD Phoenix 100 Otomatize Sistemi

İdentifikasyonu yapılan suşlar için antimikrobiyal duyarlılıkları BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemde Gram negatif bakteriler için Phoenix 100 NMIC paneli kullanıldı. *K. pneumoniae* olarak identifiye edilen suşların tek kolonisinden Phoenix ID sıvısı içerisinde PhoenixSpec nefelometre (Becton-Dickinson, ABD) ile 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu hazırlandı. Mikropipetle 25 µl bakteri süspansiyonunda alınıp AST tüpüne konulup paneldeki yuvasına boşaltıldı ve cihaza tanıtılıp yerleştirildi. Antimikrobiyal duyarlılık sonuçları 16-20 saat sonra elde edildi.

##### 4.3.2. Disk Difüzyon Testi (DDT)

BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemi ile antimikrobiyal duyarlılık sonuçları elde edildikten sonra karbapenemlerden en az birine (meropenem, imipenem veya ertapenem) direnç gösteren izolatlar DDT ile karbapenem dirençleri doğrulandı. Bu test için besiyerinden bakteri kolonilerinden steril bir öze alınarak PhoenixSpec nefelometre (Becton Dickinson, ABD) cihazı kullanılarak 0.5 Mc Farland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. MHA

besiyerinin (Oxoid, İngiltere) yüzeyine steril eküvyon çubukla plağı 90 derecelik açılarla çevirerek bakteri süspansiyonu homojen bir şekilde inoküle edildi. Agar yüzeyi inokülasyon sonrası kurutuldu ve 10 µg'ar içeriğe sahip imipenem (Oxoid, İngiltere), meropenem (Oxoid, İngiltere) ve ertapenem (Oxoid, İngiltere) diskleri aralarında 25 mm mesafe olacak şekilde MHA besiyerinin yüzeyine forseps ile yerleştirildi. EUCAST önerilerine göre kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı. Daha sonra etüve 36°C'de 18-24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü (Şekil 2). Elde edilen zon çapları değerleri aşağıda Tablo 3'de bulunan EUCAST (143) kriterlerine göre değerlendirildi.

**Tablo 3:** EUCAST karbapenem DDT inhibisyon zon çapı sınır değerleri

| Karbapenemler | Disk içeriği (µg) | Zon çapı sınır değerleri (mm) |      |
|---------------|-------------------|-------------------------------|------|
|               |                   | S* ≥                          | R* < |
| Ertapenem     | 10                | 25                            | 25   |
| Imipenem      | 10                | 22                            | 17   |
| Meropenem     | 10                | 22                            | 16   |

\*S: Duyarlı, R: Dirençli

#### 4.3.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi (SMD)

EUCAST'a göre çalışmaya dahil edilen izolatların kolistin antimikrobiyal duyarlılığı SMD yöntemi ile çalışıldı. Üremenin engellendiği en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değeri olarak alındı. Buna göre MİK değeri >2 mg/L olanlar kolistine dirençli kabul edilirken ≤2 mg/L olanlar kolistine duyarlı olarak değerlendirildi. Aşağıda Tablo 4'de EUCAST'a göre kolistin sınır değerleri verilmiştir (143).

**Tablo 4:** EUCAST SMD yöntemi ile Kolistin MİK sınır değerleri

| Antibiyotik | MİK (µg/mL) sınır değerleri |     |
|-------------|-----------------------------|-----|
|             | S ≤                         | R > |
| Kolistin*   | 2                           | 2   |

\*S: Duyarlı, R: Dirençli

#### 4.3.3.1. Stok Kolistin Sülfat Solüsyonunun Hazırlanması

Çalışmada 15,000 IU/mg ve 1000 µg/mg potense sahip kolistin sülfat (Carbosynth, İngiltere) kullanıldı. Çalışmada kullanılan toz formdaki kolistin sülfatın stok solüsyonunun konsantrasyonu 128 µg/mL olacak şekilde hazırlamak için aşağıdaki formüle göre hesaplamalar yapıldı.

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

5 mg kolistin sülfat hassas terazide tartıldı ve formüle göre 39,0625 ml distile suda çözüldü. 0,5 mL'lik ependorf tüplerine 300 µl bölünerek -80°C'de saklandı. Yapılan her çalışma için bir ependorf tüp çıkartılarak, oda ısısına gelince 1/10 steril distile su ile dilüe edildi. Böylece stok kolistin sülfat solüsyonun başlangıç konsantrasyonu 128 µg/mL oldu.

#### 4.3.3.2. Bakteri İnokülasyonu

SMD yöntemi için sıvı besiyeri olarak Mueller Hinton II Broth Katyon Ayarlı Besiyeri (Becton Dickinson lot no:8190586, ABD) (KAMHB) kullanıldı. 96 kuyucuklu, U tabanlı, polistiren mikropalakların her birine 100 µl KAMHB mikro pipetle dağıtıldı.

İlk kuyucuklara konsantrasyonu 128 µg/mL olan stok kolistin sülfat solüsyonundan 100 µg/mL ilave edilip ve 1:2 seri dilüsyon şeklinde çok kanallı mikropipet ile son kuyucuğa kadar seyreltildi. Böylelikle başlangıç konsantrasyonu 64 µg/mL son konsantrasyonu 0,03 µg/mL ile sonlanan bir seri dilüsyon yapıldı.

İzolatlar bir gece öncesinden -20°C de saklandıkları ependorflardan oda ısısına getirildikten sonra %5 KKA (RTA, Türkiye) besiyerine ekilerek canlandırma yapıldı. KKA'dan tek düşen koloniden MHA'a pasaj yapıldı ve tek kolonilerden steril öze ile bir miktar alınarak PhoenixSpec nefelometre (Becton Dickinson, ABD) cihazı ile 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  CFU/ml) bulanıklığında stok bakteri süspansiyonu hazırlandı. Stok bakteri süspansiyonunu hazırlarken dilüsyon amaçlı KAMHB kullanıldı. Stok bakteri süspansiyonundan 100 µl alındı 1900 µl KAMHB ilave edilerek 1:20

sulandırıldı ve  $5 \times 10^6$  CFU/ml konsantrasyona ulaşıldı.  $5 \times 10^6$  CFU/ml konsantrasyona sahip bakteri süspansiyonundan 0,01 ml (10 µl) alınarak kuyucuklara inoküle edildi ve böylece kuyucuktaki son bakteri konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/mL oldu. Bakteri inokülasyonu bakteri süspansiyonu hazırlandıktan sonra 15 dakika içinde uygulamanın yapılmasına ve kuyucuktaki bakteri süspansiyon hacminin toplam hacmin %10'unu geçmemesine dikkat edildi. İnokülümü yapılan 96 kuyucuklu mikropaklar üstleri kapakla kapatıldıktan sonra 35°C'lik etüvde 16-24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonra kuyucukluklardaki üreme durumuna gözle değerlendirmeleri yapıldı.

Her bir mikropakta üreme kontrolü için antibiyotiksiz kuyucuk bırakıldı. Besiyeri sterilite kontrol kuyucuğuna bakteri inokülasyonu yapılmadı. EUCAST'ın önerilerine göre kontrol suşları olarak *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve kolistin dirençli *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 pozitif) kullanıldı.

#### **4.3.3.3. İnokulum yoğunluk kontrolü**

$5 \times 10^5$  CFU/mL canlı koloni sayabilmek için inokülasyondan sonra üreme kontrol kuyucuğundan 10 µl alıp SF ile 10 ml'ye dilüe edildi. Karıştırıp KKA besiyeri üzerine yayılıp 16-20 saat 35-37°C'de inkübasyona bırakıldı. İnokülasyondan sonra koloni sayımı yapıldı 20-80 arasında olduğu için inokulumun  $5 \times 10^5$  CFU/mL olduğunun kanıtı olarak kabul edildi.

#### **4.3.3.4. Kalite kontrol ve test geçerliliği**

Kalite kontrol amacıyla kolistine duyarlı *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *E. coli* ATCC 25922, kolistin dirençli *E. coli* NCTC 13846 (mcr-1 pozitif) kullanıldı. Bu suşlar çalışmada kullanılan antibiyotik çözeltileri kullanılarak, başka bir plakta test edildi.

Test plağında besiyeri sterilite kontrol kuyucuğunda üreme olmaması, üreme kontrol kuyucuğunda üreme olması, kalite kontrol suşlarının beklenen MİK değeri aralığında çıkması, inokulum saflık ve inokulum yoğunluk sonuçları beklenen şekilde bulunduğu test geçerli kabul edilip, mikropaklar okundu.

#### 4.4. Moleküler Yöntemler

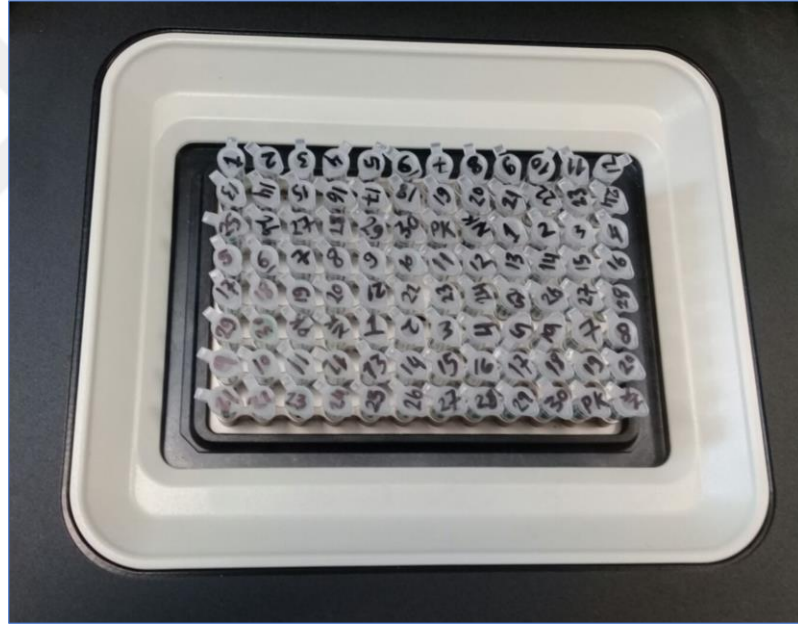
Çalışmaya dahil edilen KDKp izolatlarında *blaOXA-23*, *blaOXA-24*, *blaOXA-48*, *blaOXA-58* genleri beraber; *blaKPC*, *blaNDM-1*, *blaVIM*, *blaNDM-1*, *blaIMP* beraber hazırlanıp multipleks PCR yöntemi ile çalışıldı. *blaOXA-51*, *blaOXA-55* ve *mcr-1* geni monopleks PCR yöntemiyle ayrı ayrı çalışıldı. Bu çalışmada kullanılan primerler Tablo 5’de verildi (164).

**Tablo 5:** Bu çalışmada kullanılan primerlerin özellikleri

| Oligo adı | Baz Dizisi 5’-3’                                    | Amplikon Boyutu (bp) |
|-----------|-----------------------------------------------------|----------------------|
| CLR5      | F: CGGTCAGTCCGTTTGTTC<br>R: CTTGGTCGGTCTGTAGGG      | 305                  |
| OXA-23    | F: GATCGGATTGGAGAACCAGA<br>R: ATTTCTGACCGCATTTCCAT  | 501                  |
| OXA-24    | F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA<br>R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT  | 246                  |
| OXA-48    | F: TTGGTGGCATCGATTATCGG<br>R: GAGCACTTCTTTTGTGATGGC | 743                  |
| OXA-51    | F: TAATGCTTTGATCGGCCTTG<br>R: TGGATTGCACTTCATCTTGG  | 353                  |
| OXA-55    | F: CATCTACCTTTAAAATTCCC<br>R: AGCTGTTCTGCTTGAGCAC   | 975                  |
| OXA-58    | F: AAGTAT TGGGGCTTGTGCTG<br>R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC | 599                  |
| IMP       | F: CATGGTTTGGTGGTTCTTGT<br>R: ATAATTTGGCGGACTTTGGC  | 488                  |
| VIM       | F: ATTGGTCTATTTGACCGCGTC<br>R: TGCTACTCAACGACTGAGCG | 780                  |
| NDM-1     | F: GAGATTGCCGAGCGACTTG<br>R: CGAATGTCTGGCAGCACACTT  | 497                  |
| KPC       | F: ATGTCAGTGTATCGCCGTCT<br>R: TTTTCAGAGCCTTACTGCCC  | 893                  |

#### 4.4.1.1. Multipleks PCR Yöntemi

Bu yöntemle *bla*OXA-23, *bla*OXA-24, *bla*OXA-48, *bla*OXA-58 primerleri beraber; *bla*KPC, *bla*NDM-1, *bla*VIM, *bla*KPC, *bla*NDM-1, *bla*IMP primerleri beraber çalışıldı. KDKp izoaltları çalışmadan bir gece öncesinde -20°C'deki derin dondurucudan oda ısısına çıkartıldı. %5 KKA besiyerine canlandırma pasajı yapıldı. MHA besiyerine pasaj edilerek bakteri saf olarak büyütüldü. Saf kolonilerden bir öze dolusu alarak 1,5 ml'lik ependorfa 500 µl Fosfat Tamponlu Tuzlu Suda (PBS, Sigma, Almanya) içine bırakıldı, vortekslendi. 4 McFarland bulanıklığına eşit bir bakteri süspansiyonu hazırlandı. Isı bloğunda 10-15 dakika 100°C'de kaynatıldı. Kaynatma işlemi (Resim 1) ile bakteri hücrelerinden DNA ekstrasyonu sağlandı. 13500 rpm' de, 3-5 dakika santrifüj edildi.

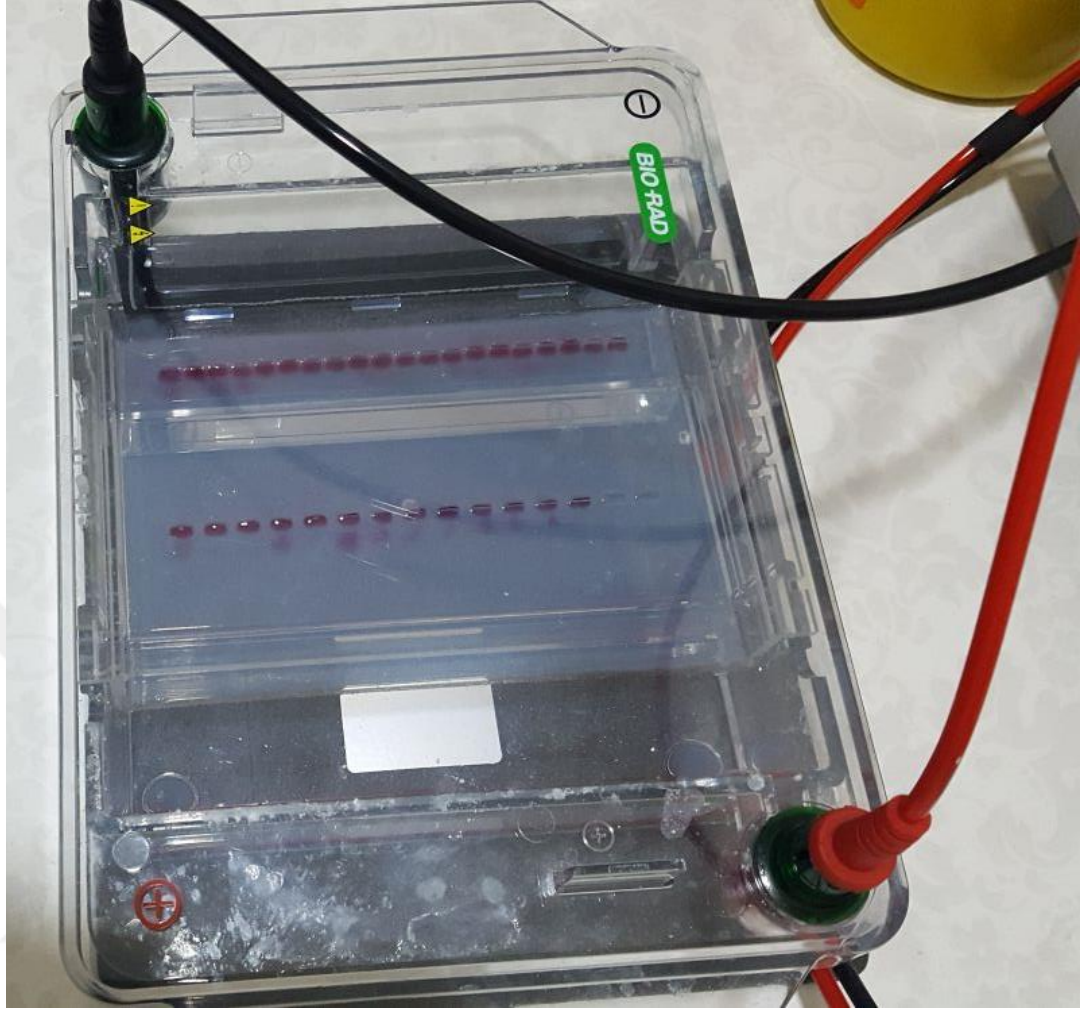


**Resim 1:** Isı bloğunda kaynatılan izolatların DNA'sının ekstraksiyon işlemi

Süpernatant kısmı (DNA içeriğinin bulunduğu kısım) bir sonraki aşamalarda kullanılmak üzere alındı. Süpernatant DNA kaynağı olarak kullanıldı. Primerlerin geldiği ticari konsantrasyon 100 pmol olduğu için nükleaz free su ile seyreltilerek stok primer solüsyonu hazırlandı. PCR reaksiyonu, her bir primerden 1 pmol ve 25 µL'lik bir nihai reaksiyon hacminde 12.5 U Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific-Fermentas Corporation, Vilnius, Litvanya) kullanılarak hazırlandı. Örneğin tüpteki

toplam hacim 25 µl olduğu için 12,5 µl Taq DNA polimeraz (Thermo Scientific-Fermantas Corporation, Vilnius, Litvanya) kullanıldı. Her bir ependorf içinde 8 µl toplam primer hacmi ve 12,5 µl Taq DNA polimeraz ile 20,5 µl hacme ulaşıldı. Her bir izolatın DNA ekstratlarından 4,5 µl ilave edilerek her bir ependorf nihai hacim 25 µl'ye tamamlandı. DNA ekstratları ilave edildikten sonra her bir ependorf amplifikasyon aşaması için termal döngü cihazına (Thermo Fisher, ABD) yerleştirildi, şu amplifikasyon koşulları kullanıldı: 4 dakika boyunca 94 ° C'de ilk denatürasyon, ardından 30 saniye boyunca 94 ° C'lik 40 döngü, 40 saniye boyunca 52 ° C ve 50 saniye boyunca 72 ° C'lik, son bir uzatma adımında 10 dakika boyunca 72 ° C.

Multiplex PCR çalışıldığı için %2'lik agaroz jel hazırlandı. 0,5x TBE (Tris, Borik asit, EDTA) hazırlandı. TBE ticari olarak 10x olduğu için distile su ile 0,5x'e dilüe edildi. 1,6 gr (%2'lik agaroz jel için) agaroz tartıldı erlene koyuldu, üzerine 80 ml 0,5x TBE ilave edildi. İlk başta kesinlikle karıştırılmayıp, mikrodalgaya konuldu, 2-3 dakika bekletildi, kaynamasına izin verilmeden agarın erimesi sağlandı. Mikrodalga fırınından çıkartıldıktan sonra karıştırılıp homojen hale getirildi. Jel berraklaşınca kalıba döküldü ve 15 dakika içinde dondu. Jelden tarak çıkartıldı. Jelde 16 kuyucuk meydana geldi. 4 µl amplikon + 2 µl UV boya karıştırılıp her bir kuyucuğa bırakıldı(resim). 50 dakika boyunca 95 V ve değışken akımda amplikonlar elektroforezde (Bio RAD, ABD) yürütüldü. Hem pozitif kontrol hem de amplikonların kaç baz çifti (bp) olduğunu anlamak için ilk kuyucuğa DNA ladder konuldu. Diğerk kuyucuklara izolatlara ve pozitif kontrol suşuna ait amplikonlar konuldu. Görüntülemek için Gel Doc™ XR+ (Bio Rad, ABD) cihazı kullanıldı.



**Resim 2:**95 V ve değişken akımda amplikonların jel elektroforezde (Bio RAD, ABD) yürütülmesi

#### 3.4.1.2.Monopleks PCR Yöntemi

Bu çalışmada bu yöntemle *blaOXA-51*, *blaOXA-55* ve *mcr-1* geni monopleks PCR yöntemiyle ayrı ayrı çalışıldı. Multipleks PCR'dan farklı olarak her bir izolat için hazırlanan ependorf hacmi; 2  $\mu$ l toplam primer hacmi (1  $\mu$ l F, 1  $\mu$ l R primer olmak üzere) ve 12,5  $\mu$ l Taq DNA polimeraz ile 4,5  $\mu$ l nükleazsız suyun üzerine her bir izolatın 4,5  $\mu$ l DNA ekstraktı ilave edilerek her bir ependorf nihai hacim 25  $\mu$ l'ye tamamlandı. Bundan sonraki amplikasyon aşaması ve jel elektroforezinde amplikonların yürütülmesi ve jelin görüntülenmesi multipleks PCR ile aynı şekilde yapıldı. Ancak monopleks PCR için hazırlanan agoroz jel %1 olarak hazırlandı.

#### 3.4.1.3.Kalite kontrol suşları

Bu çalışmada kolistin dirençli *mcr-1* pozitif kontrol suşu *E. coli* NTCC 13846 kullanıldı. *K. pneumoniae* NCTC 13443 (NDM-1), *E. coli* NCTC 13476 (IMP), *A. baumannii* NCTC 13301 (OXA-23) ve *A. baumannii* ATCC 19606 (OXA-51), *A. baumannii* NCTC 13302 (OXA-58), *K. pneumoniae* NCTC 13442 (OXA-48), *K. pneumoniae* NCTC 13439 (VIM-1) suşları kullanıldı.



## 5. BULGULAR

Bu çalışmada Dicle Üniversitesi Hastaneleri yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalardan alınan kan örneklerinin kan kültür şişelerinden izole edilen KDKp izolatları incelemeye alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen 33 KDKp izolatın 19'u (%58) kadın, 14'ü (%42) erkek hastalardan izole edilmiştir. Bu hastaların 5'i çocuktur. Kadın hastaların ortalama yaşları 55,4; erkek hastaların ise 47,4'tür.

İzolatların 8'i (%24,24) Göğüs TBC, 7'si (%21,21) Dahiliye, 5'i (%15,15) Çocuk, 4'ü (%12,12) Nöroloji, 3'ü (%9,09) Hematoloji, 2'si (%0,06) Kardiyoloji, 2'si (%0,06) Anestezi, 1'i (%0,03) Acil ve 1'i (%0,03) Gastroenteroloji YBÜ'lerinde yatan hastalardan gelen kan örneklerinden izole edilmiştir.

### 5.1. Fenotipik Yöntemlere Ait Bulgular

#### 5.1.1. BD Phoenix™ 100 otomatize sistemine ait bulgular

BD Phoenix otomatize sistem antibiyotik duyarlılıkları piperasilin- tazobaktam için % 93,94 (n = 31) R (dirençli), % 6,06 (n = 2) S (duyarlı); amikasin için % 69,70 (n = 23) R, % 30,30 (n = 10) S; gentamisin için % 66,67 (n = 22) R, % 33,33 (n = 11) S; siprofloksasin için % 84,85 (n = 28) R, % 15,15 (n = 5) S; seftazidim için % 90,91 R (n = 30), % 9,09 (n = 3) S; sefepim için % 87,88 R (n = 29), % 9,09 (n = 3) S ve % 3,03 (n = 1) I (orta duyarlı); trimetoprim-sülfametaksazol için % 87,88 (n = 29) R, % 12,12 (n = 4) S; kolistin için % 48,48 (n = 16) R, % 51,52 (n = 17) S; ve ertapenem için % 96,97 (n = 32) R, % 3,03 (n = 1); imipenem için % 60,61 (n = 20) R, % 3,03 (n = 1) S ve % 36,36 (n = 12) I; meropenem için % 84,85 (n = 28) R, % 9,09 (n = 3) S ve % 6,06 (n = 2) şeklindedir. BD Phoenix'e ait bulgular Tablo 6'da verilmiştir.

**Tablo 6:** BD Phoenix otomatize sistem antibiyotik duyarlılık sonuçları

| Antibiyotikler                   | S  |       | I  |       | R  |       |
|----------------------------------|----|-------|----|-------|----|-------|
|                                  | n  | %     | n  | %     | n  | %     |
| Piperasilin-tazobaktam(TZP)      | 2  | 6,06  | 0  | 0     | 31 | 93,94 |
| Amikasin(AMK)                    | 10 | 30,30 | 0  | 0     | 23 | 69,70 |
| Gentamisin(GEN)                  | 11 | 33,33 | 0  | 0     | 22 | 66,67 |
| Siprofloksasin(CIP)              | 5  | 15,15 | 0  | 0     | 28 | 84,85 |
| Seftazidim(CAZ)                  | 3  | 9,09  | 0  | 0     | 30 | 90,91 |
| Sefepim(FEP)                     | 3  | 9,09  | 1  | 3,03  | 29 | 87,88 |
| Kolistin(CST)                    | 17 | 51,52 | 0  | 0     | 16 | 48,48 |
| Trimetoprim-Sülfametaksazol(SXT) | 4  | 12,12 | 0  | 0     | 29 | 87,88 |
| Ertapenem(ETP)                   | 1  | 3,03  | 0  | 0     | 32 | 96,97 |
| İmipenem(IPM)                    | 1  | 3,03  | 12 | 36,36 | 20 | 60,61 |
| Meropenem(MEM)                   | 3  | 9,09  | 2  | 6,06  | 28 | 84,85 |

### 5.1.2. DDT (Kirby-Bauer) Yöntemine ait bulgular

BD Phoenix<sup>TM</sup> 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile karbapenemlerden biri veya birkaçına orta dirençli veya dirençli bulunan izolatların karbapenem direnci EUCAST'ın (143) önerdiği yöntem DDT (Kirby-Bauer) ile doğrulandı. Karbapenem direnci doğrulanan 33 adet KDKp izolatı ile bu çalışmaya devam edildi. EUCAST karbapenem sınır değerlerine (Tablo 7) göre değerlendirilip olup KDKp izolatlarının ertapenem, imipenem ve meropenem zon çapları ölçüldü, Tablo 8'de verilmiştir.

**Tablo 7:** EUCAST karbapenem antimikrobiyalleri DDT zon çapı sınır değerleri

| Karbapenem | Disk içeriği(µg) | Zon çapı sınır değerleri(mm) |    |
|------------|------------------|------------------------------|----|
|            |                  | S <sub>≥</sub>               | R< |
| Ertapenem  | 10               | 25                           | 25 |
| İmipenem   | 10               | 22                           | 17 |
| Meropenem  | 10               | 22                           | 16 |

DDT yöntemi ile çalışılan KDKp izolatlarının hepsi (%100) ertapenem dirençli; 9'u (%27,27) imipeneme dirençli; 23'ü (%69,7) meropeneme dirençli olarak tespit edildi.

**Tablo 8:** Karbapenem\* antibiyotiklerine karşı BD Phoenix 100 otomatize sisteminin sonuçları ve DDT zon çapları bulguları

| Örnek no | BD Phoenix 100 Otomatize Sistem |     |     | DDT (Kirby-Bauer) Zon çapı (mm) |                  |                  |
|----------|---------------------------------|-----|-----|---------------------------------|------------------|------------------|
|          | Etp                             | İpm | Mem | Etp (10 µg) disk                | İpm (10 µg) disk | Mem (10 µg) disk |
| 1        | R                               | I   | S   | 17                              | 18               | 19               |
| 2        | R                               | I   | I   | 10                              | 19               | 20               |
| 3        | R                               | R   | R   | 6                               | 9                | 10               |
| 4        | R                               | I   | R   | 14                              | 23               | 19               |
| 5        | R                               | R   | R   | 6                               | 13               | 7                |
| 6        | R                               | R   | R   | 0                               | 16               | 12               |
| 7        | R                               | R   | R   | 6                               | 19               | 12               |
| 8        | R                               | R   | R   | 6                               | 12               | 14               |
| 9        | R                               | I   | R   | 16                              | 21               | 22               |
| 10       | R                               | R   | R   | 10                              | 22               | 18               |
| 11       | R                               | S   | S   | 16                              | 19               | 12               |
| 12       | R                               | I   | R   | 6                               | 15               | 7                |
| 13       | R                               | I   | I   | 8                               | 17               | 6                |
| 14       | R                               | R   | R   | 6                               | 17               | 9                |

|    |   |   |   |    |    |    |
|----|---|---|---|----|----|----|
| 15 | R | I | R | 7  | 19 | 6  |
| 16 | R | R | R | 6  | 19 | 10 |
| 17 | R | R | R | 6  | 16 | 12 |
| 18 | R | I | R | 17 | 18 | 7  |
| 19 | R | R | R | 8  | 17 | 6  |
| 20 | R | R | R | 10 | 19 | 20 |
| 21 | R | R | R | 9  | 20 | 14 |
| 22 | R | I | R | 6  | 22 | 7  |
| 23 | R | I | S | 16 | 20 | 22 |
| 24 | R | R | R | 8  | 20 | 18 |
| 25 | R | R | R | 6  | 16 | 12 |
| 26 | R | I | R | 10 | 22 | 8  |
| 27 | S | R | R | 16 | 17 | 14 |
| 28 | R | R | R | 20 | 16 | 17 |
| 29 | R | R | R | 7  | 14 | 8  |
| 30 | R | R | R | 11 | 16 | 8  |
| 31 | R | R | R | 8  | 22 | 10 |
| 32 | R | R | R | 11 | 19 | 16 |
| 33 | R | I | R | 15 | 15 | 6  |

\*Etp: Ertapenem, Mem: Meropenem, İpm: İmipenem

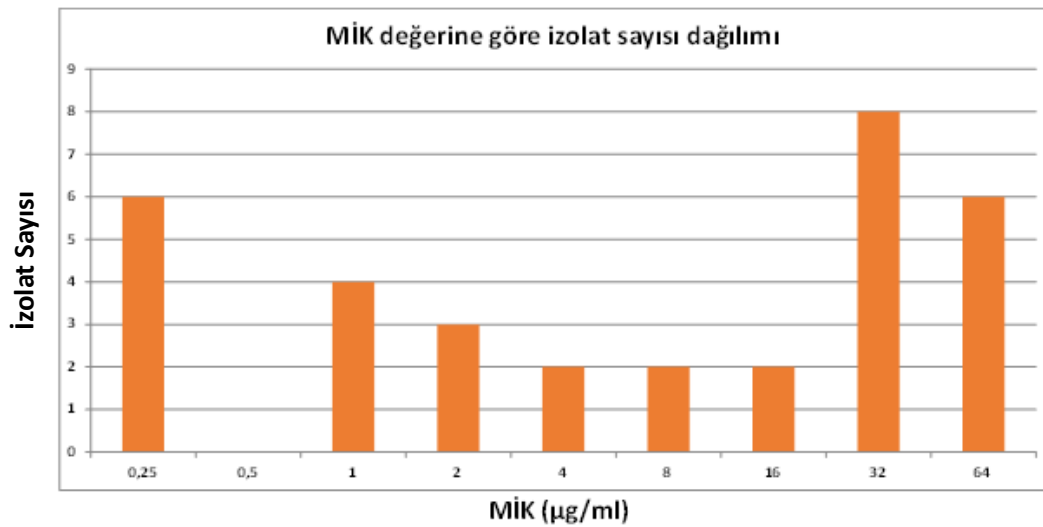
### 5.1.3. Sıvı Mikrodilüsyon (SMD) Yöntemine Ait Bulgular

EUCAST'ın önerilerine göre çalışmaya dahil edilen 33 KDKp kolistin MİK değerleri SMD yöntemi ile tespit edilmiştir. EUCAST'a göre kolistin MİK değeri >2 mg/L olanlar kolistine dirençli, ≤2 mg/L olanlar kolistine duyarlı olarak değerlendirildi. Tablo 9'da çalışılan her bir izolatın kolistin MİK değeri verildi (143).

**Tablo 9:** SMD yöntemi ile elde edilen her bir izolatın MİK değeri ve duyarlılık durumu ve aynı izolatların otomatize sistem duyarlılık durumları

| Örnek no | SMD Yöntemi        |            | Otomatize Sistem | Örnek no | SMD Yöntemi        |            | Otomatize Sistem |
|----------|--------------------|------------|------------------|----------|--------------------|------------|------------------|
|          | MİK değeri (µg/ml) | Duyarlılık | Duyarlılık       |          | MİK değeri (µg/ml) | Duyarlılık | Duyarlılık       |
| 1        | 1                  | S          | S                | 18       | 0,25               | S          | S                |
| 2        | 16                 | R          | R                | 19       | 32                 | R          | R                |
| 3        | 4                  | R          | S                | 20       | 1                  | S          | R                |
| 4        | 64                 | R          | R                | 21       | 64                 | R          | S                |
| 5        | 32                 | R          | S                | 22       | 32                 | R          | R                |
| 6        | 8                  | R          | S                | 23       | 2                  | S          | S                |
| 7        | 64                 | R          | R                | 24       | 0,25               | S          | S                |
| 8        | 64                 | R          | R                | 25       | 32                 | R          | R                |
| 9        | 64                 | R          | R                | 26       | 0,25               | S          | R                |
| 10       | 32                 | R          | S                | 27       | 1                  | S          | S                |
| 11       | 4                  | R          | S                | 28       | 0,25               | S          | S                |
| 12       | 32                 | R          | R                | 29       | 0,25               | S          | S                |
| 13       | 8                  | R          | R                | 30       | 2                  | S          | R                |
| 14       | ≥64                | R          | R                | 31       | 32                 | R          | R                |
| 15       | 16                 | R          | R                | 32       | 1                  | S          | S                |
| 16       | 0,25               | S          | S                | 33       | 2                  | S          | S                |
| 17       | 32                 | R          | S                |          |                    |            |                  |

SMD yöntemi ile bulunan kolistin MİK değerlerine göre izolatların sayısal dağılımı Grafik 1’de verilmiştir.



**Grafik 1:** SMD yöntemine göre kolistin MİK değerlerindeki izolat sayılarının dağılımı.

## 5.2. Moleküler Yöntemlere Ait Bulgular

### 5.2.1. Karbapenemaz Genlerine Ait PCR Bulguları

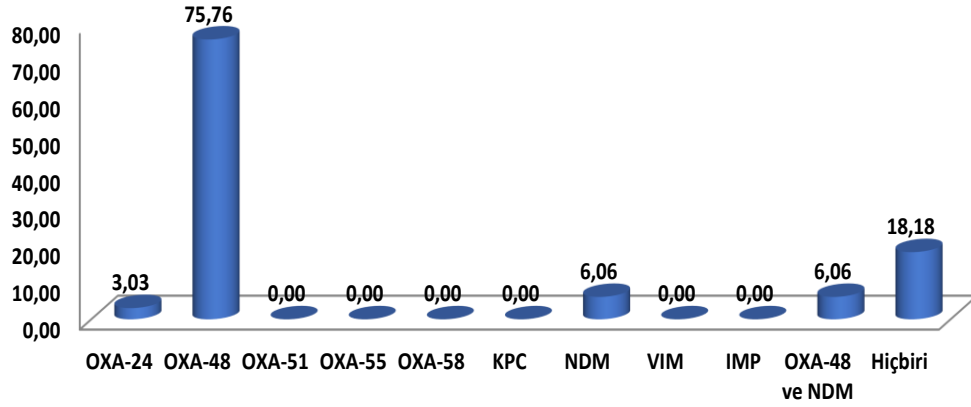
Çalışmada KDKp izolatları; *bla*OXA-23 (650 bp), *bla*OXA-24 (246 bp), *bla*OXA-48 (743 bp), *bla*OXA-58 (599 bp), *bla*KPC (893 bp), *bla*NDM-1 (476 bp), *bla*VIM (380 bp), *bla*IMP (188 bp) gibi karbapenemaz direncinden sorumlu genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *bla*OXA-51 (353 bp), *bla*OXA-55 (975 bp) monopleks PCR yöntemi ile çalışılmıştır.

Toplam çalışılan 33 adet KDKp izolatının PCR yöntemi ile saptanan karbapenemazlar genlerindeki pozitiflik oranları Tablo 10 ve Grafik 2 verilmiştir. Bu oranlar *bla*OXA-48 için %75,76 (n = 25), *bla*NDM-1 %6,06 (n =2), *bla*OXA-24 için %3,03 (n = 1) şeklinde saptandı. İzolatlar arasında *bla*OXA-23, *bla*OXA-51, *bla*OXA-55, *bla*OXA-58, *bla*KPC, *bla*VIM ve *bla*IMP tespit edilmedi. İki (%6,06) izolatın hem *bla*OXA-48 hem de *bla*NDM-1 genleri taşıdığı görülmüdü.

**Tablo 10:** PCR yöntemi ile tespit edilen karbapenemaz genlerinin dağılımı.

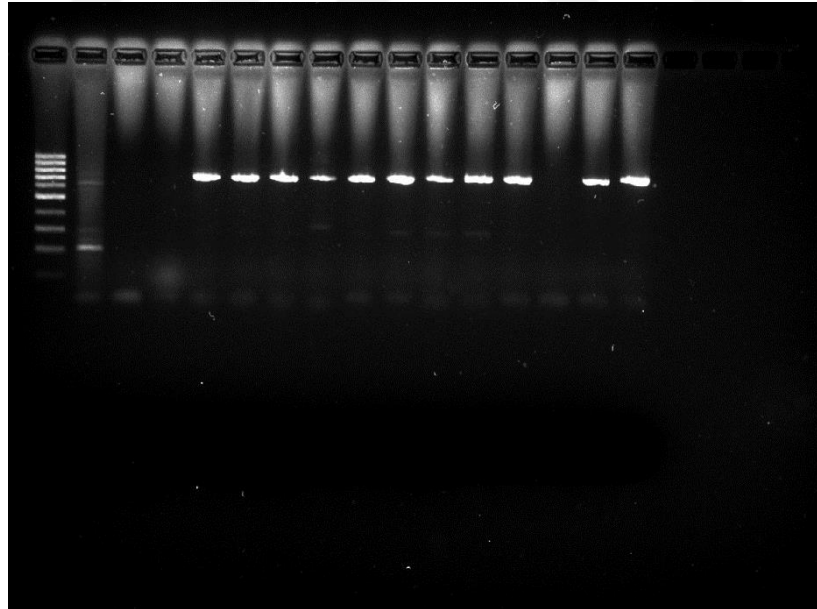
| Karbapenemaz Genleri                  | Yüzde (%) | Adet |
|---------------------------------------|-----------|------|
| <i>bla</i> OXA-24                     | 3,03      | 1    |
| <i>bla</i> OXA-48                     | 75,76     | 25   |
| <i>bla</i> OXA-51                     | -         | -    |
| <i>bla</i> OXA-55                     | -         | -    |
| <i>bla</i> OXA-58                     | -         | -    |
| <i>bla</i> KPC                        | -         | -    |
| <i>bla</i> NDM <sub>1</sub>           | 6,06      | 2    |
| <i>bla</i> VIM                        | -         | -    |
| <i>bla</i> IMP                        | -         | -    |
| <i>bla</i> OXA-48 ve <i>bla</i> NDM-1 | 6,06      | 2    |
| Hiçbiri                               | 18,18     | 6    |

## Karbapenemaz Genlerinin Yüzde Dağılımı



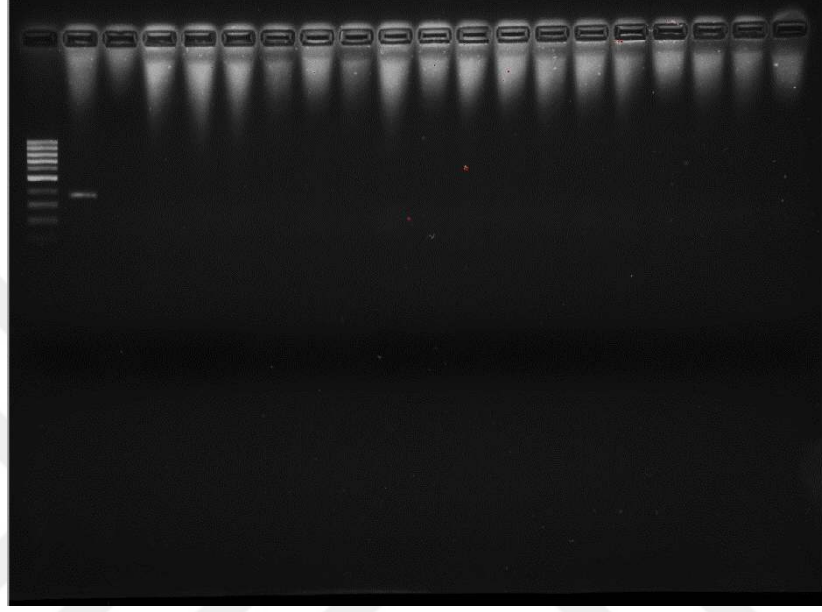
**Grafik 2 :** KDKp 33 izolatın PCR yöntemleri ile saptanan karbapenemazlar genlerinin yüzde dağılımı

*bla*OXA-23 (650 bp), *bla*OXA-24 (246 bp), *bla*OXA-48 (743 bp), *bla*OXA-58 (599 bp) çalışılan bazı izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü Resim 3’de verilmiştir.



**Resim 3:** 19-30 nolu izolatların agaroz jel elektroforez görüntüsü. Soldan 1. kuyucuk DNA ladder (100 bp-1000 bp), 2. kuyucuk pozitif kontrol. OXA-48 (743 bp)

*bla*OXA-51 (353 bp) ve *bla*OXA-55 (975 bp) monopleks PCR ile çalışıldı. Çalışmaya dahil edilen 33 adet KDKp izolatının hiçbirinde *bla*OXA-51 (353 bp) (Resim 4) ve *bla*OXA-55 (975 bp) genleri tespit edilmedi.

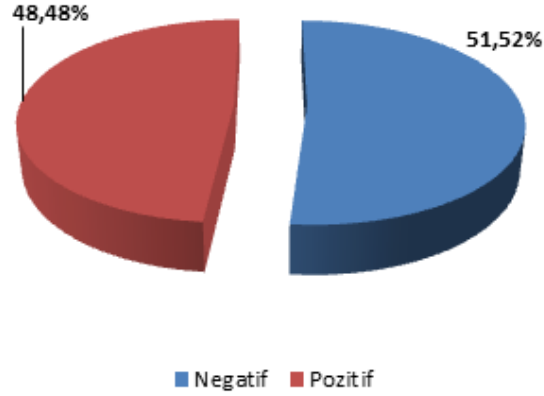


**Resim 4:** OXA-51 (353 bp) agaroz jel elektroforezinde görüntüsü. Soldan 1.kuyucuk DNA ladder 2. kuyucuk *A. baumannii* ATCC 19606 pozitif kontrol, 6. kuyucuk negatif kontrol, diğer kuyucuklar çalışmadaki 1-17 nolu izolatlar

#### **5.2.2. Kolistin direnci ile ilişkili plazmid aracılı *mcr-1* genine ait PCR bulguları**

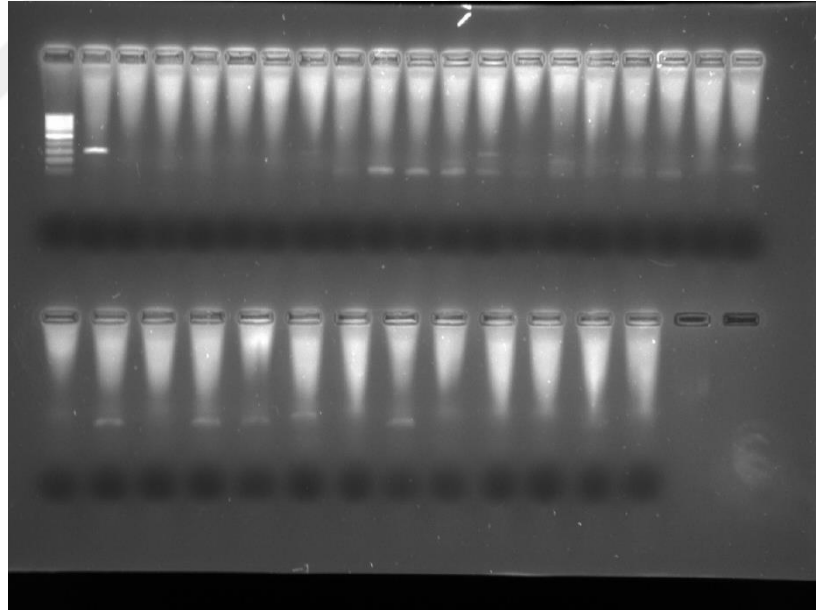
Bu çalışmada kolistin direncinden sorumlu moleküler direnç mekanizmasını araştırmak için plazmid-aracılı direnç geni olan *mcr-1*'in varlığı monopleks PCR yöntemi ile araştırıldı. 33 adet KDKp izolatından 16'sı (%48,48) *mcr-1* geni pozitif, 17'si (%51,52) ise *mcr-1* geni negatif olduğu tespit edildi Grafik 3'verilmiştir.

### MCR-1 Geni % Dağılımı



**Grafik 3:** *mcr-1* geninin yüzde (%) dağılımı

*mcr-1* (305 bp) geni monopleks PCR yöntemi ile araştırılmış Resim 5’de çalışmadaki bazı izolatların agaroz jel görüntüsü verilmiştir.



**Resim 5:** Üst soldan 1. Kuyucuk DNA ladder (100 bp-1000 bp), 2. Kuyucuk kolistin dirençli *E. coli* NTCC 13846 (*mcr-1* pozitif) (305 bp), 6.kuyucuk *mcr-1* negatif kontrol suşu ve diğer kuyucuklar 1-30 nolu KDKp izolatlarına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.

### 5.3. Fenotipik ve Moleküler Yöntemlere Ait Bulgular

Çalışmaya dahil edilen 33 KKDp’den multipleks PCR ile *blaOXA-48* geni tespit edilen 25 (%93,94) izolatın içinden DDT yöntemine göre hepsi (%100) ertapeneme,

11'i (%44) imipeneme; 21'i (%84) meropeneme, BD Phoenix otomatize sistem ADT'ye göre 23'ü (%93,54) piperazilin-tazobaktama, 22'si (%70,97) amikasin, 16'sı (%64) gentamisine, 23'ü (%92) siprofloksasine, 24'ü (%96) seftazidime, 24'ü (%96) sefepime ve 14'ü (%56) kolistine dirençli bulundu. *blaOXA-48* geni taşıyan 25 izolattan 15'i (%48,39) aynı zamanda *mcr-1* geni taşıdığı tespit edildi.

Çalışmaya dahil edilen 33 adet KDKp izolatın 22'si (%66,67) amikasin ve/veya gentamisin antibiyotiklerine duyarlı bulundu. MİK değerine göre kolistin dirençli bulunan izolatlarının (n=20) 11'i (%55) amikasin ve/veya gentamisine duyarlı bulundu. Mcr-1 pozitif izolatlardan (n=16) 9'u (%56,35) amikasin ve/veya gentamisine duyarlı bulundu. MİK veya *mcr-1* pozitiflik oranına göre amikasin ve/veya gentamisine duyarlılık yüzdeleri arasında dikkate değer fark bulunmadı.

Çalışmada DDT yöntemi ile karbapenemlere karşı duyarlılıklarını ölçtüğümüz izolatların PCR yöntemi ile tespit edilen karbapenemaz genlerinin varlığına göre zon çaplarının ortalamalarını incelediğimizde Tablo 11'deki gibi bulgular elde edildi. *blaOXA-48* geni taşıyan izolatlar 25 adet, sadece *blaOXA-48* geni bulunduran 23 adet olarak saptandı. Bu 23 izolatın DDT yöntemi ile elde edilen ertapenem zon çapı ortalaması 7,96 mm'dir. Hem *blaOXA-48* hem de *blaNDM* genini beraber bulunduran 2 adet izolatın ertapenem zon çapları ortalaması 11,00 mm'dir ve sadece *OXA-48* geni taşıyanlara göre daha fazla olduğu görüldü. *blaOXA-48* negatif olanların sadece *blaOXA-48* pozitiflere göre ertapenem zon çapının yaklaşık olarak iki kat daha fazla olduğu görüldü. Meropenem zon çapı ortalaması sadece *blaOXA-48* geni bulunanlarda 11,78 mm iken *blaNDM-1* geninin de eşlik ettiği 2 izolatta meropenem zon çapının daha az olduğu hesaplandı.

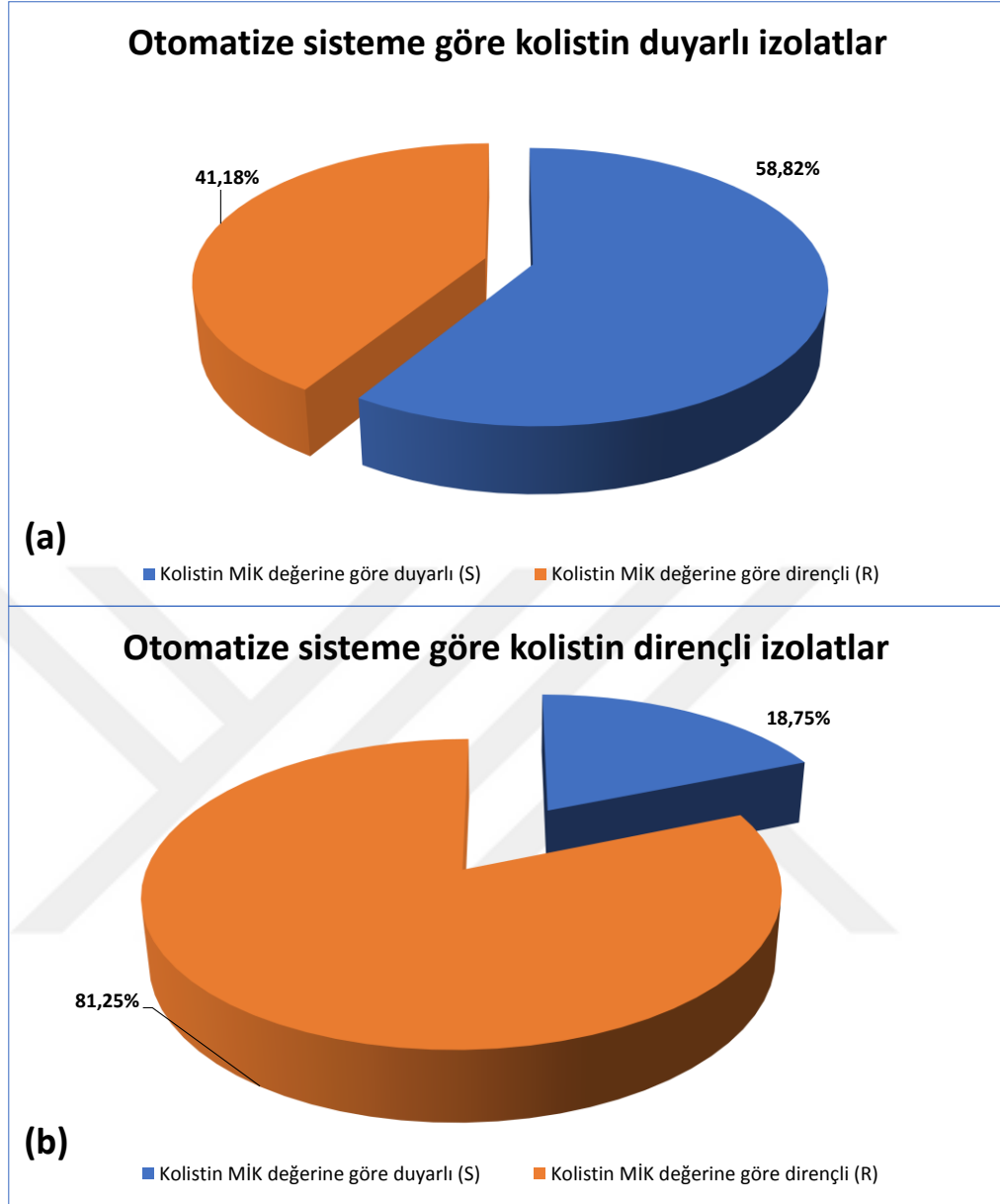
**Tablo 11:** İzolatların karbapenemaz gen varlığına göre karbapenem\* zon çapı ortalamaları.

|                                     | Sadece<br><i>blaOXA-48</i> pozitif | <i>blaOXA-48</i> ve<br><i>blaNDM-1</i> pozitif | <i>blaOXA-48</i><br>negatif |
|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|-----------------------------|
| İzolat sayısı                       | 23                                 | 2                                              | 8                           |
| Ertapenem ortalama<br>zon çapı (mm) | 7,96                               | 11,00                                          | 14,87                       |
| İmipenem ortalama zon<br>çapı (mm)  | 17,13                              | 15,50                                          | 19,38                       |
| Meropenem ortalama<br>zon çapı (mm) | 11,78                              | 7,00                                           | 16,25                       |

BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre çalışmaya dahil edilen 33 adet KDKp izolatının kolistin duyarlılıkları incelendiğinde 17'sinin kolistine duyarlı(S), 16'sının da dirençli (R) olduğu görüldü. SMD yöntemi ile elde edilen kolistin MİK değerlerine göre de 33 adet KDKp izolatın 13'ü S, 20'si R bulundu (Tablo 12). Grafik 4'te otomatize sisteme göre kolistin S 17 adet izolatın MİK değerine göre 10'unun (%58,82) S, 7'sinin (%41,18) R; kolistin R 16 adet izolatın MİK değerine göre 13'ünün (%81,25) R, 3'ünün (%18,75) de S olduğu verilmiştir.

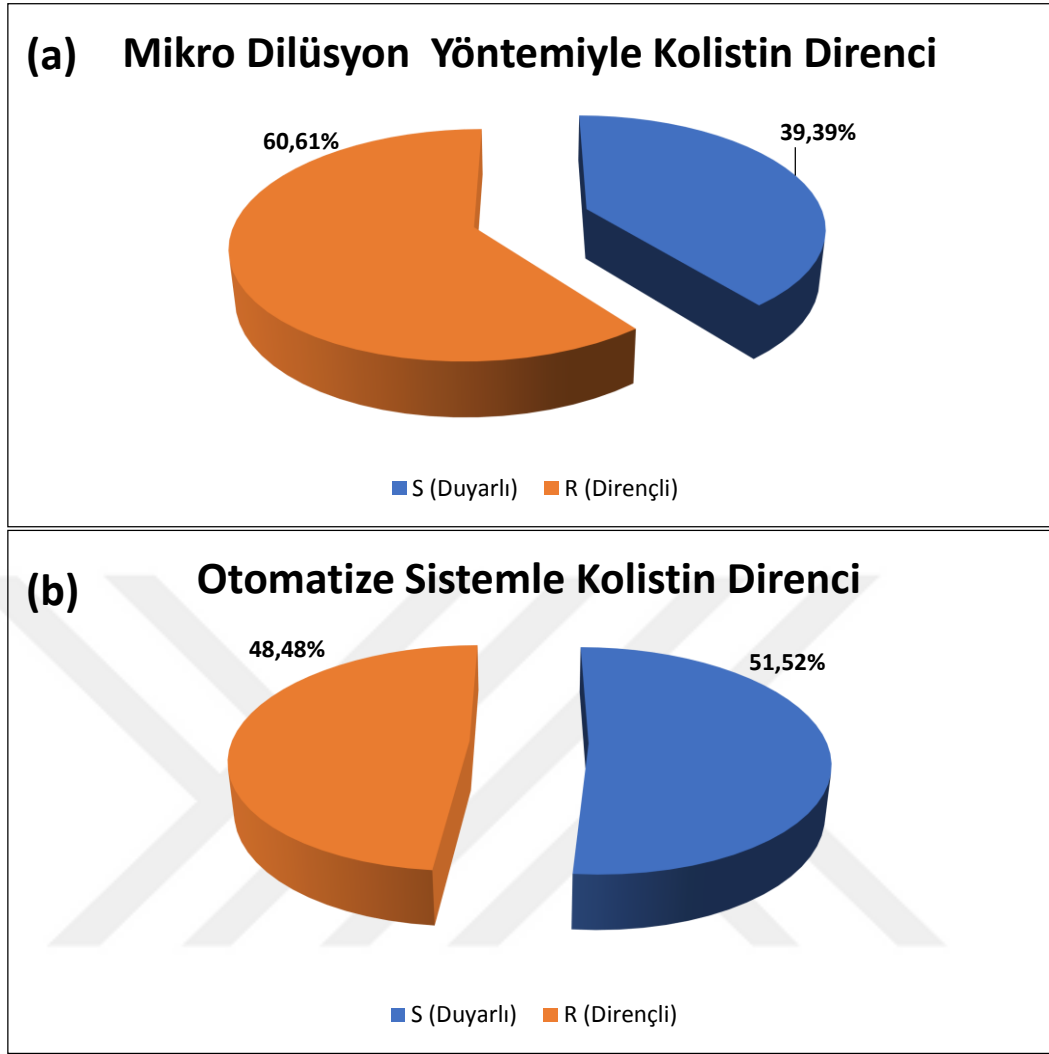
**Tablo 12:** Otomatize sistem ve SMD yöntemine göre kolistin duyarlılık bulgularının karşılaştırmasına ait bulgular

|                | Otomatize sistem<br>kolistin S izolat<br>sayısı | Otomatize sistem<br>kolistin R izolat<br>sayısı | Toplam |
|----------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|--------|
| Kolistin MİK S | 10                                              | 3                                               | 13     |
| Kolistin MİK R | 7                                               | 13                                              | 20     |
| Toplam         | 17                                              | 16                                              | 33     |



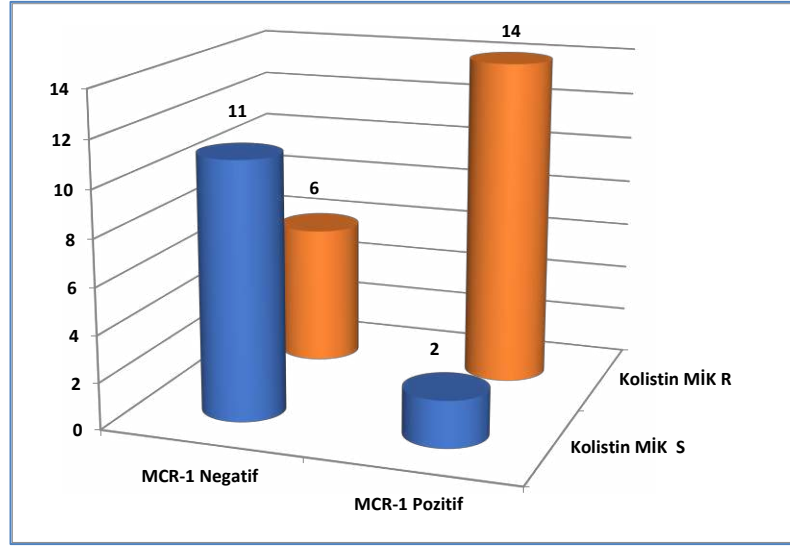
**Grafik 4:** a) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin duyarlı izolatların kolistin MİK değerlerine göre duyarlılık yüzdeleri. b) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin dirençli izolatların kolistin MİK değerlerine göre duyarlılık yüzdeleri.

SMD yöntemiyle çalışılan izolatların %60,61'i kolistine dirençli ve %39,39'u duyarlı bulundu. BD Phoenix otomatize sisteme göre kolistin duyarlılık yüzdeleri %48,48 dirençli, %51,52 duyarlı bulundu. Kolistin duyarlılık yüzdeleri Grafik 5'te verilmiştir.

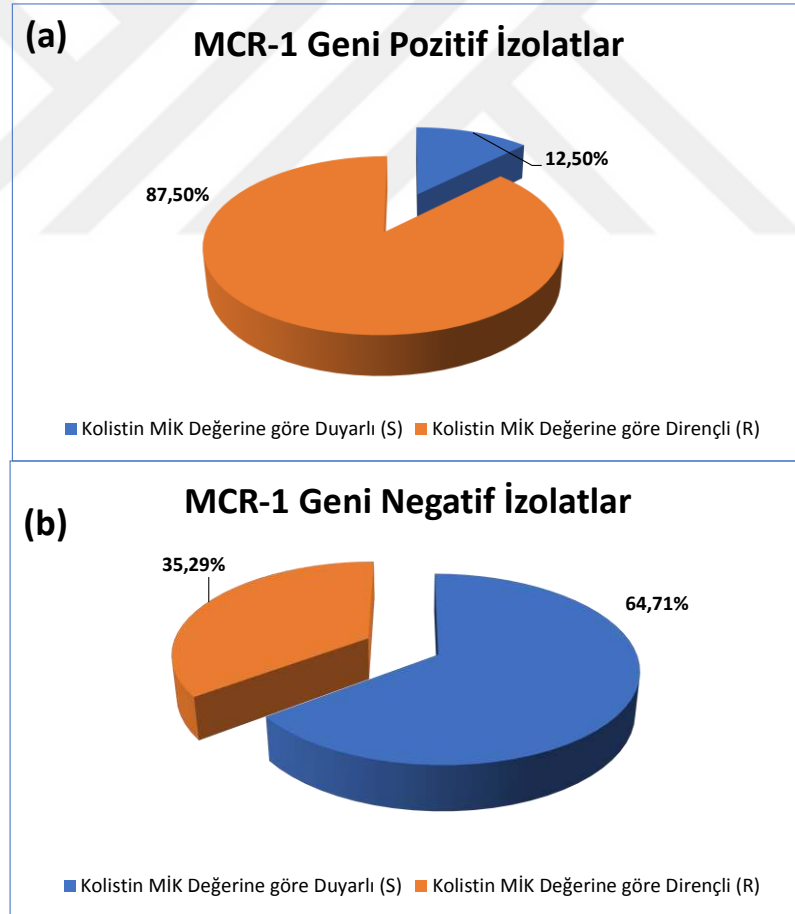


**Grafik 5:** a) SMD yöntemi kolistin duyarlılıkları yüzde oranları b) Otomatize sistem kolistin duyarlılıkları yüzde oranları

Çalışmada PCR yöntemi ile elde edilen *mcr-1* geni pozitiflik sayıları ile SMD yöntemiyle saptanan kolistin duyarlılık sayıları bulguları Grafik 6'da verilmiştir. 33 KDKp izolatın 16'sı *mcr-1* geni pozitif, 17'si *mcr-1* geni negatif bulundu. Grafik 7 'de *mcr-1* geni pozitif izolatlar arasında kolistin MİK değerine göre 14'ü (%87,50) R, 2'si S; *mcr-1* geni negatif izolatlar arasında 6'sı (%35,29) R, 11'i (%64,71) de S olarak verilmiştir.

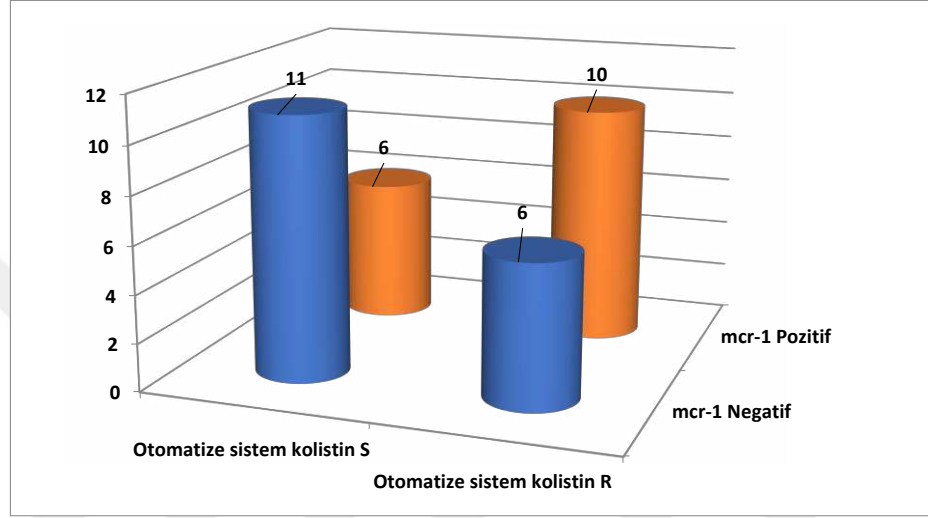


**Grafik 6:** *mcr-1* geni ile kolistin MİK değeri bulguları arasındaki kıyaslamaya ait bulgular

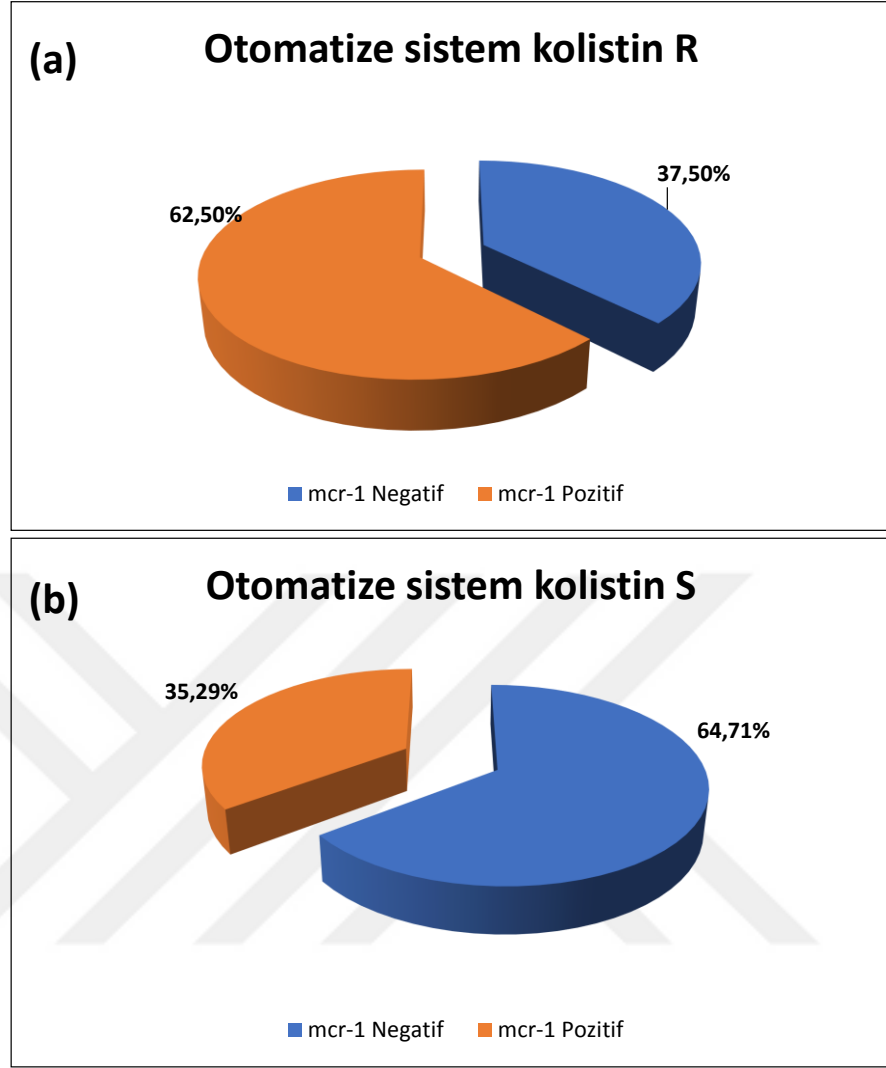


**Grafik 7** a) *mcr-1* geni pozitif izolatlar arasında kolistin MİK değerine göre duyarlılık yüzdeleri. b) *mcr-1* geni negatif izolatlar arasında kolistin MİK değerine göre duyarlılık yüzdeleri.

Grafik 8’de BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sisteme göre 17 kolistin S, 16’sı kolistin R izolatların *mcr-1* pozitif ve negatif olduğu verilmiştir. Grafik 9’de otomatize sisteme göre kolistin duyarlı izolatların 11’i (%64,75) *mcr-1* negatif, 6’sı (%35,29) *mcr-1* pozitif olarak hesaplandı. Otomatize sisteme göre kolistin R izolatların 6’sı (%37,50) *mcr-1* negatif, 10’u (%62,50) *mcr-1* pozitif bulundu.



**Grafik 8:** BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistem kolistin duyarlılık ile *mcr-1* geni bulgularının sayısal kıyaslamasına ait bulgular



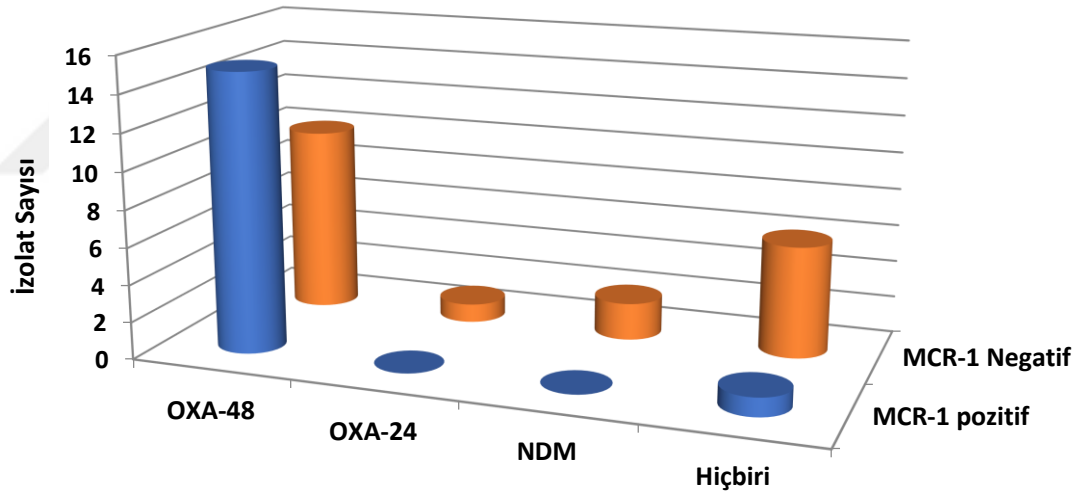
**Grafik 9:** BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin duyarlı izolatların mcr-1 pozitif ve negatif yüzdeleri. b) BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, A.B.D) otomatize sistemine göre kolistin dirençli izolatların kolistin mcr-1 pozitif ve negatif yüzdeleri

SMD yöntemi ile elde edilen MİK değerine göre  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  olan 13 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 20,3 gün iken MİK  $>2$   $\mu\text{g/ml}$  olan 20 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 33,9 gün olarak hesaplandı. 32  $\mu\text{g/ml}$  MİK değerine sahip 8 hastanın ortalama hastanede yatış süresi 37,63 gün; 64  $\mu\text{g/ml}$  MİK değeri olan 6 hastanın 34,2 gün olarak hesaplandı. *mcr-1* negatif olan 17 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 21,8 gün; *mcr-1* pozitif 16 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 35,7 gün olarak hesaplandı.

Tablo 13’de verildiği üzere OXA-48 pozitif (n=25) izolatın 15’i *mcr-1* pozitif, 10’u negatif bulundu. NDM-1 pozitif (n=2) izolatın 2’si *mcr-1* negatif bulundu. OXA-24 pozitif (n=1) izolat ise *mcr-1* negatif bulundu. Grafik 10’da oranları gösterilmiştir.

**Tablo 13: Karbapenemazların *mcr-1* pozitiflik bulguları**

| Karbapenemaz | MCR-1 pozitif | MCR-1 Negatif |
|--------------|---------------|---------------|
| OXA-48       | 15            | 10            |
| OXA-24       | 0             | 1             |
| NDM-1        | 0             | 2             |
| Hiçbirisi    | 1             | 6             |



**Grafik 10: Karbapenemazların *mcr-1* pozitiflik bulguları**

Çalışmaya dahil edilen KDKp izole edilen 33 hastadan 9’unun (%27,3) hastaneden yatarken ölümü gerçekleşti. Kolistin MİK değerine göre ölen hasta izolatlarının kolistine dirençli olduğu tespit edildi. Ayrıca ölen hastaların 5’i 64 µg/ml, 2’sinin 32 µg/ml, 1’i 16 µg/ml ve 1’i 4 µg/ml kolistin MİK değerine sahiptir. Bu ölen 9 hastanın 7’si *mcr-1* pozitif iken 2’si *mcr-1* negatiftir. MİK değerine göre kolistin dirençli (>2 µg/ml) bulunan 20 hastanın mortalite oranı %45 (n=9) iken

duyarlı olanlarda ölüm tespit edilmedi. *mcr-1* pozitiflerde (n=16) mortalite oranı %43,75(n=7), *mcr-1* negatiflerde (n=17) ise bu oran %11,8 (n=2) olarak hesaplandı.

Çalışmaya dahil edilen 33 adet KDKp izolatın 22'si (%66,67) amikasin ve/veya gentamisin antibiyotiklerine duyarlı bulundu. MİK değerine göre kolistin dirençli bulunan izolatlarının (n=20) 11'i(%55) amikasin ve/veya gentamisine duyarlı bulundu. Mcr-1 pozitif izolatlardan (n=16) 9'u (%56,35) amikasin ve/veya gentamisine duyarlı bulundu. MİK veya mcr-1 pozitiflik oranına göre amikasin ve/veya gentamisine duyarlılık yüzdeleri arasında dikkate değer fark bulunmadı.



## 6. TARTIŞMA

Karbapenemler GSBL pozitif Gram negatiflerin neden olduğu enfeksiyonlar için kullanılmaktadır ve ilk kez 1993'te karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KDKp) ortaya çıkmıştır (43). KDKp prevalansı küresel olarak artarken ve neden olduğu enfeksiyonlar insan sağlığı için tehdit haline gelmiştir. Mevcut sınırlı tedavi seçenekleri nedeniyle yüksek mortalite oranına sahiptir (6). Son yıllarda, kolistin ÇİD *K. pneumoniae* enfeksiyonları için son çare tedavi haline gelmiştir. Bununla birlikte, dünyanın birçok ülkesinden kolistin direnci rapor edilmiştir ve prevalansı artmaya devam etmektedir. Bu yüzden özellikle hastanede yatan hastalardan izole edilen *K. pneumoniae*'lerde karbapenem ve kolistin direncinden sorumlu mekanizmaların moleküler olarak tespiti, uygun ve etkin tedavi ve epidemiyolojik olarak önem arz etmektedir (44).

Vardakas ve ark. yaptığı çalışmaya göre; GSBL pozitif izolatların  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklere ve geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç göstermesi durumunda kliniklerde özellikle *K. pneumoniae* kaynaklı bakteriyemilerde geniş spektrumlu sefalosporinler ile amikasin kombine edilerek tedavide etkin olduğunu göstermilerdir (165). Çalışmamızdaki bütün izolatlar BD Phoenix 100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile elde edilen bulgular doğrultusunda GSBL pozitif bulunmuştur. Çalışılan izolatların GSBL pozitiflik oranı ile 3.kuşak sefalosporinlere (seftazidim gibi) gösterdikleri direnç eşleşmektedir. GSBL üreten *K. pneumoniae*'lerin 3. kuşak sefalosporinlerine direnç durumunda tedavide tercih edilen 4. Kuşak sefalosporin olan sefepime karşı da direnç oranı %87,88'dir. Amikasin için %69,70 bulunmuştur ve bu sonuç amikasin duyarlı KDKp enfeksiyonlarında amikasin ile kombine edilen bir karbapenem tercih edilebilmesine imkan sağlayacaktır.

Ambler D Sınıfı karbapenemaz olan OXA-48 ilk kez 2003 yılında Türkiye'de izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tanımlanmıştır (105). O zamandan bu yana nozokomiyal salgınların kaynağı olarak OXA-48 üreten *K. pneumoniae*'ler Türkiye'den birçok kapsamlı çalışma rapor edilmiştir (166). Carrër A ve ark. farklı

ülkelerden topladıkları KDKp izolatlarının OXA-48 ürettiklerini ve Türkiye dışında da Avrupa, Ortadoğu ve Afrika da birçok ülkede yayıldığını göstermişlerdir(167). *Davarcı ve ark.* hastanelerinde 71.1% OXA-48 pozitiflik oranı bildirerek hastanelerindeki nozokomiyal salgına önlemler düşünmüşlerdir(168). Bu çalışmada ise ülkemizdeki oranlardan farklı olamayan OXA-48 pozitiflik oranı (%75,76) bulunmuştur.

*Crowley ve ark.* yaptıkları bir çalışmada SHV-2  $\beta$ -laktamaz ekspresyonu ve azalmış OmpK35 ve OmpK36 porin seviyelerinin sefalosporinlere ve karbapenemlere dirençte artışa sebep olduğunu göstermişlerdir (169). OXA-48 enzimi penisilinleri başarıyla hidrolize edebilir, ancak geniş spektrumlu sefalosporinlere (seftazidim, sefotaksim, sefepim gibi), karbapenemlere karşı zayıf aktivite gösterir veya hiç aktivite göstermez. Bu çalışmada multipleks PCR yöntemi ile OXA-48 geni tespit edilen 25 (%93,94) izolatın içinden DDT yöntemine göre hepsi (%100) ertapeneme dirençli; 11'i (%44) imipeneme dirençli; 21'i (%84) meropeneme dirençli; (%93,54) piperazilin-tazobaktama dirençli; 22'si (%70,97) amikasinine dirençli; 16'sı (%64) gentamisine dirençli; 23'ü (%92) siprofloksasine dirençli; 24'ü (%96) seftazidime dirençli; 24'ü (%96) sefepime dirençli; 14'ü(%56) kolistine dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada elde edilen bulgulara OXA-48 pozitif izolatlardaki karbapenemlere, seftazidim ve sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere direnç oranının oldukça yüksek olmasının nedeni GSBL AmpC sefalosporinazlardan ve/veya porin kaybı ile ilişkilendirilebilir (170).

*Neuner ve ark.* yaptıkları çalışmada hastanelerinde YBÜ'lerinde yatan kan dolaşım enfeksiyonu hastalarından alınan kan örneklerinden izole edilen OXA-48 pozitif KDKp'ler %86 kolistine, %45 amikasin ve %22 de gentamisine duyarlı bulunmuştur (171). Bu çalışmada da OXA-48 pozitif izolatların en az direnç gösterdikleri antibiyotikler sırasıyla kolistin (%56), gentamisin (%64), amikasin (%70,97)'dir. Bu sonuçlar da gösteriyor ki KDKp bakteriyemilerde tedavi seçeneği olarak kolistin, amikasin ve gentamisin tercih edilebilir.

NDM-1 ilk olarak 2009 yılında Hindistan'da hastaneye yatırılan bir hastanın idrar örneğinden izole edilen *K. pneumoniae* suşunda keşfedilmiştir (13). Daha sonra

Balkanlar ve Orta Doğu'ya yayılmıştır (172). *Poirel ve ark.* çalışması Türkiye'den bildirilen ilk NDM-1 raporu olup 2011 yılında daha önce Irak'ta hastaneye yatırılan allojenik kök hücre nakli yapılan lösemi hastasından izole edilen *K. pneumoniae* suşuna dayanmaktadır (173). Türkiye'de çok merkezli bir çalışmada *Grundmann ve ark.* 124 adet KDKp izolatını incelemiş ve 9 adet (%7,25) KDKp izolatında NDM-1 tipi karbapenemaz bulmuştur (174). *Çakar ve ark.* yaptığı çok merkezli başka bir çalışmada tek başına NDM %6,5 oranında bulunmuşken NDM+OXA-48 beraber bulunma oranı ise sadece %2,4 olarak tespit edilmiştir (175). Bu çalışmada ise %6,06 oranında NDM-1, NDM-1+OXA-48 şeklinde saptanmıştır ve bulgular Türkiye'de yapılan çok merkezli çalışmalarla ters düşmemektedir.

Başka bir plazmid aracılı metallo-β-laktamaz VIM ilk olarak 1997'de İtalya'da bildirilmiştir (176). Türkiye'de VIM-1 başlangıçta *Yıldırım ve ark.* tarafından 2005 yılında 3 yaşındaki kızın idrarından *K. pneumoniae*'den izole edilmiştir. *Grundmann ve ark.* yaptıkları çok uluslu bir çalışmada, Türkiye'den gönderilen 124 karbapeneme duyarlı olmayan *K. pneumoniae* izolatlarının %4'ünde VIM pozitif bulunmuştur (174). Bu çalışmada ise hiçbir *K. pneumoniae* izolatında VIM bulunmamıştır.

Bildirilen raporlara göre; KPC üreten izolatlar çoğunlukla Yunanistan, ABD ve İsrail'de bulunmuştur. Tanımlanan ilk KPC üreten izolat bir *K. pneumoniae* olsa; ikinci bir raporda KPC üreten izolat *K. oxytoca* (177, 178) olarak verilmiştir. ABD'de yapılan bir çalışmada, KDKp izolatlarının %90'ında KPC pozitifliği saptanmış ve başka bir karbapenemaz geni tanımlanmamıştır (179). *Grundmann ve ark.* yaptıkları çok merkezli Avrupa ülkeleri çalışmasında Türkiye'deki 17 merkezden 124 örnek üzerinde çalışılmış ve hiçbir örnekte KPC enzimi saptanmamıştır (174). Bu çalışmada da Türkiye'de pek yaygın olmayan bir karbapenemaz tipi olan KPC enzimi saptanmamıştır.

IMP Sınıf B metallo-beta laktamazdır, aztreonam hariç bütün β-laktamları hidrolize eder. IMP tipi enzimler Japonya'daki *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* ve *Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygınlaşmıştır (180). Türkiye'de IMP ilk olarak 2005 yılında bir yaşındaki bir kızın kanından izole edilen *K. pneumoniae*'de *Aktas ve ark.* tarafından bildirilmiştir (181). Daha sonra *Sağiroğlu ve ark.*

karbapenemaz taraması yaptıkları çalışmada 102 KDKp izolatın hiçbirinde IMP enzimine rastlamamışlardır (182). Daha çeşitli bölgeleri içeren *Çakar ve ark.* EuSCAPE (European Survey on Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae) projesi kapsamında, Türkiye'nin değişik bölgelerindeki merkezlerden izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığını ve enzim tiplerini belirledikleri çalışmada 124 KDKp'nin sadece 2 (%1,6) tanesinde IMP enzimine rastlamışlardır (175). Türkiye'de yapılan çalışmalar gösteriyor ki IMP tipi enzim oranı ülkemizde çok yüksek değildir nerdeyse yok sayılacak kadar azdır. Bu çalışmada ise IMP enzimi tespit edilmemiştir.

*K. pneumoniae*'de kolistin direnci, Avrupa, Kuzey Amerika, Güney Amerika, Asya ve Güney Afrika dahil olmak üzere birçok bölgeden bildirilmiştir. Klinik olarak izole edilmiş *K. pneumoniae* suşlarında en yüksek toplam kolistin direnç oranı Yunanistan'da %10,5-20 arasında, ardından Güney Kore %6,8, Singapur'da %6,3 rapor edilmiştir. Yunanistan'ın antibiyotiklere direnç için bir sıcak nokta olduğunu göstermiştir. Kuzey Amerika, Avrupa, Latin Amerika ve Asya-Pasifik bölgesindeki farklı merkezleri içeren küresel SENTRY Antimikrobiyal Sürveyans Programından (2006-09) elde edilen veriler, *K. pneumoniae*'deki genel kolistin direnç oranının %1,5 olduğunu ortaya koymuştur. Latin Amerika'da %2,1 ve bunu Kuzey Amerika %1,8 ile izlemiştir. Latin Amerika'daki kolistin direnci kademeli olarak %1,3'ten (2006) %3,0'a (2009) yükselmiştir. SENTRY'ye göre, bu popülasyonlar için kolistin direnç oranları (%4,4-85.7), *K. pneumoniae* izolatlarında genel kolistin direncini değerlendiren çalışmalarda bildirilenlerden daha yüksek gözükmemektedir. Yoğun bakım ünitesi hastalarında özellikle yüksek kolistin direnç oranları %20-55.2 bildirilmiştir (45). Çalışmamızda kolistin duyarlılığı fenotipik olarak SMD yöntemi ve otomatize sistemin sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. Yöntemler arasındaki farklılıklar ayrıca tartışılacaktır. BD Phoenix 100 otomatize sistemi kolistin duyarlılığı için %48,48 dirençli, %51,52 duyarlı bulunmuştur. SMD yöntemine göre %60,61 dirençli, %39,39 duyarlı bulunmuştur. Farklı yöntemlere göre değişen kolistin duyarlılık oranları olsa da (%48,48-%60,61) YBÜ'lerdeki yüksek direnç oranları ile ters düşmemektedir.

*Giacobbe ve ark.* yaptıkları kontrollü kohort çalışmasında hastanelerindeki YBÜ'lerinde KDKp izolatlarında kolistin direncinin varlığı ile hastanede yatış süresinin 30 gün ve üzeri olması gibi risk faktörlerinin %51 gibi yüksek mortalite ile sonuçlandığını saptamışlardır (183). Bu tez çalışmasında SMD yöntemi ile MİK değeri  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  olan 13 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 20,3 gün iken MİK  $> 2$   $\mu\text{g/ml}$  olan 20 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 33,9 gün olarak hesaplanmıştır. 32  $\mu\text{g/ml}$  MİK değerine sahip 8 hastanın ortalama hastanede yatış süresi 37,63 gün; 64  $\mu\text{g/ml}$  MİK değeri olan 6 hastanın 34,20 gün olarak hesaplanmıştır. *Mcr-1* negatif olan 17 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 21,8 gün; *mcr-1* pozitif 16 hastanın hastanede yatış süresi ortalaması 35,7 gün olarak hesaplanmıştır. 33 hastadan 9'u (%27,3) ölümle sonuçlanırken kolistin MİK değerine göre ölen hastaların hepsi kolistine dirençli bulunmuştur. Bu ölen hastaların 5'i 64  $\mu\text{g/ml}$ , 2'sinin 32  $\mu\text{g/ml}$ , 1'i 16  $\mu\text{g/ml}$  ve 1'i 4  $\mu\text{g/ml}$  kolistin MİK değerine sahip olduğu görülmüştür. *Mcr-1* pozitifler hastalarda (n=16) mortalite oranı %43,75(n=7), *mcr-1* negatiflerde (n=17) ise bu oran %11,8 (n=2) olarak hesaplanmıştır. Bu ölen 9 hastanın 7'si *mcr-1* pozitif iken 2'si *mcr-1* negatif olarak tespit edilmiştir. MİK değerine göre kolistin dirençli ( $> 2$   $\mu\text{g/ml}$ ) bulunan 20 hastanın mortalite oranı %45 (n=9) iken duyarlı olanlarda ölüm tespit edilmemiştir. MİK değerindeki artış ile yani kolistine duyarlılığın azalması ile *mcr-1* pozitiflik oranı ile hastanede yatış süresi arttığı tespit edilmiştir. Aynı şekilde hem *mcr-1* pozitiflik hem de MİK değerindeki artış mortalite ile ilişkili tespit edilmiştir.

*Poirel ve ark.*'nın yaptıkları çalışmaya göre 100 enterobakteriyel izolatı (60 kolistin dirençli ve 40 kolistin duyarlı izolat) test ederek bu sistemin doğruluğunu değerlendirmişler ve yüksek oranda (%15) yanlış duyarlı sonuç bulduklarını yayınlamışlardır (48). Bu çalışmada ise BD Phoenix otomatize sistemine göre kolistin dirençli 16 izolatın, SMD yöntemi MİK değerine göre 13'ü (%81,25) dirençli, 3'ü (%18,75) de duyarlı saptanmıştır. %18,75 yanlış duyarlı bulgusu literatür ile uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada; otomatize sisteme göre kolistin duyarlı izolatlardan 11'i (%64,75) *mcr-1* negatif, 6'sı (%35,29) *mcr-1* pozitif olarak tespit edilmiştir. *Poirel ve ark.*, *K. pneumoniae* ve *E. cloacae* izolatlarında BD Phoenix otomatize sisteminde kolistin hetero-rezistansını saptamak için düşük

duyarlılık, ancak plazmid-aracılı kolistin direncini saptamak için iyi bir duyarlılık gözlemlemiştir (48).

*Hadjadj ve ark.* yaptıkları araştırmada tüm dünyada şu an en yaygın olan mcr varyantı *mcr-1* olsa da *K. pneumoniae*'de mcr genleri arasında *mcr-3* ve *mcr-8* varyantlarını da bildirilmişlerdir. Bu varyantların kolistine duyarlılığı etkilediğini bildirmişlerdir. Aynı zamanda farklı antibiyotik direnç genlerinin birlikte görülmesi ve aynı izolatta mcr genlerinin varlığı özellikle de *mcr-8* geni beta-laktamlar, aminoglikozitler, sülfonamidler, florokinolonlar, fenikoller ve trimetoprim de direnç kazandırabilen bir plazmid tarafından taşındığını genom analizi ile göstermişlerdir. (184). Çalışmamızda *mcr-1* negatif (n=17) olup SMD yöntemine göre MİK değerleri dirençli (n=6) olan isolatlar bulunmuştur. Aynı zamanda *mcr-1* pozitif olanlar arasında farklı antibiyotik gruplarına farklı direnç profili tespit edilmiştir. Bunun sebebi de farklı mcr varyantları olabilir.

Yukarıdakilere ek olarak; *Jayol ve ark.* tarafından ilk kez kolistine karşı direnç gösteren ÇİD *Klebsiella pneumoniae* isolatlarda kolistin-dirençli alt popülasyon, l-aminoarabinoz sentezinden ve polimiksin direncinden sorumlu *pmrHFIJKLM* ekspresyonunu aktive eden PhoP-PhoQ iki bileşenli sistemin bir parçası olan PhoP proteininde tek bir amino asit değişikliğine (Asp191Tyr) sahip olduğunu ve PhoP geni ile yapılan tamamlama deneylerinde kolistin'e tam duyarlılığını geri kazandığını bulmuşlardır. Daha sonra, kolistin duyarlı alt popülasyonun analizi, PhoP geninde, kolistin dirençli alt popülasyona kıyasla kısmi bir delesyon (25 bp) olduğunu bulmuşlardır. Bu delesyon, PhoP'nin okuma çerçevesini bozarak daha uzun ve aktif olmayan bir proteine (255'e karşı 223 amino asit uzunluğunda) yol açtığını tespit etmişlerdir. Bu, mutasyonların PhoP'in kolistin direncine katılımını gösteren ilk rapordur. Ayrıca, *K. pneumoniae*'de kolistin heterorezistansına yol açan mekanizmaları deşifre eden ilk çalışmadır.

*Jayol ve ark* ayrıca kolistin hetero-direncini, bir suboptimal polimiksin konsantrasyonuna maruz kalma ile ilişkili olabilecek başka türlü duyarlı ( $\leq 2$  mg / litre MİK) bir alt popülasyonla kolistin direncinin ortaya çıkması olarak tanımlamışlardır. Kolistin için in vitro duyarlılık test yöntemlerinin karşılaştırılması,

Etest ve agar dilüsyon yöntemlerinin, bazı otomatik yöntemlerin aksine dirençli alt popülasyonları tespit etmek için güvenilir olduğunu göstermişlerdir; Bununla birlikte, sıvı mikrodilüsyon yöntemi, kolistin MİK'lerinin belirlenmesi için hala referans testi olmaya devam etmektedir (185). Bu çalışmada, kolistin MİK değerlerini saptamak için EUCAST kriterlerine göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi yapılmıştır. Çalışmamızda MİK değeri  $\leq 2$  mg/litre olan ama *mcr-1* pozitif saptanan iki izolatın MİK değerleri 0,25 ve 2,0 mg/L'dir. Bu izolatların fenotipik olarak SMD yöntemi ile kolistin MİK değerlerindeki duyarlılığının olma sebebi PhoP genindeki delesyon mutasyonu olabilir.



## 7. SONUÇLAR

*K. pneumoniae*'de karbapenem ve kolistin direnci, Türkiye'de yoğun bakım ve hastane ortamlarında önemli bir halk sağlığı sorunudur. Ülkemizde en çok tespit edilen karbapenemaz enzim tipi Ambler Sınıf D kategorisinde olan OXA-48, bu çalışmada da en çok tespit edilen karbapenemazdır. Son zamanlarda, KDKp enfeksiyonlarında son tercih olan kolistine karşı direncin artması ile bu direncin altında yatan moleküler mekanizmaların en yaygın olanı *mcr-1*'in tespiti önem arz etmektedir. Sonuç olarak, *K. pneumoniae*'lerde karbapenemaz ve *mcr-1* genlerinin belirlenmesi uygun antimikrobiyal tedavisi ve epidemiyolojik öneme sahiptir.

KDKp'nin patojen olduğu dolaşım yolu enfeksiyonlarında klinik izolatlarda karbapenemaz tipinin belirlenmesi ve *mcr-1* geninin varlığının tespiti hastaların tedavisine yön vermektedir. Direnç genlerinin tespiti; hastanın hayatta kalmasını, hastanede yatış süresini etkileyecek tedavi protokollerine yol gösterir. Bu çalışmada kolistin direncinin hastanede artan yatış süresine ve yüksek mortaliteye neden olduğunu göstermiş olduk.

*K. pneumoniae* klinik izolatlarında kolistin ve karbapenem direnç mekanizmaları tespit edilmeli ve izolatlar moleküler epidemiyolojik yöntemlerle izlenmelidir. YBÜ'lerinde yatan hastalarda karbapenem ve kolistin direncinin izlemi; yaş, komorbidite, antibiyotik geçmişi, hastanede yatış süresi, invaziv girişim durumu gibi mortalite risk faktörleri de rapor edilerek takip edilmelidir.

Otomatize antibiyotik duyarlılık sistemlerinden elde edilen kolistin duyarlılık sonuçlarının EUCAST/CLSI önerilerine uygun olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile doğrulanması gerekir. Ayrıca, her hastane kendi yanlış duyarlılık yüzdelerini tespit etmelidir.

Çalışmada EUCAST ve CLSI ortak çalışma grubunun referans yöntem olarak önerdiği sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile izolatların kolistin MİK değerleri bulunsa da bu yöntem rutinde oldukça zahmetli ve tekrar edilebilirliği de güçtür.

Hastane enfeksiyon kontrol önlemleri sıkı tutularak, türler ve cinsler arası yatay gen transferi ile geçişi kolay olan plazmid aracılı olan karbapenemazların ve mcr genlerinin özellikle YBÜ'lerinde lokal salgınlara neden olmasının önüne geçilmelidir.



## 8. KAYNAKLAR

1. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*. 1983;11(6):315-7.
2. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*. 2008;8(3):159-66.
3. Mugnaioli C, Luzzaro F, De Luca F, Brigante G, Perilli M, Amicosante G, et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2700-6.
4. Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(4):969.
5. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(10):5873.
6. Perez F, van Duin D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A menace to our most vulnerable patients. *Cleveland Clinic journal of medicine*. 2013;80:225-33.
7. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(6):1953-8.
8. Beringer P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 2001;7(6):434-40.
9. Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymyxins Revisited. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008;21(3):449.
10. Ling Z, Yin W, Shen Z, Wang Y, Shen J, Walsh TR. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2020.
11. Sanchez G, Master R, Clark R, Fyyaz M, Duvvuri P, Gupta E, et al. *Klebsiella pneumoniae* Antimicrobial Drug Resistance, United States, 1998–2010. *Emerging infectious diseases*. 2013;19:133-6.

12. Zander DS, Farver CF. Pulmonary Pathology: Churchill Livingstone/Elsevier; 2008.
13. Ryan KJ, Ray CG, Ahmad N, Drew WL, Plorde JJ. Sherris Medical Microbiology, Fifth Edition: McGraw-Hill Education; 2009.
14. Magill S, Edwards J, Bamberg W, Beldavs Z, Dumyati G, Kainer M, et al. Multistate Point- Prevalence Survey of Health Care- Associated Infections. The New England journal of medicine. 2014;370:1198-208.
15. Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. Infection control : IC. 1985;6(2):68-74.
16. Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future microbiology. 2014;9:1071-81.
17. [Available from: <https://www.cdc.gov/hai/organisms/klebsiella/klebsiella.html>.
18. Falkow S. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity — a personal recollection 15 years later. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(1):67-72.
19. Domenico P, Salo RJ, Cross A, Cunha BA. Polysaccharide Capsule-Mediated Resistance to Opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. Infection and immunity. 1994;62:4495-9.
20. Podschun R, Ullmann U. <em>Klebsiella</em> spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(4):589.
21. Pan Y-J, Lin T-L, Chen Y-H, Hsu C-R, Hsieh P-F, Wu M-C, et al. Capsular Types of *Klebsiella pneumoniae* Revisited by *wzc* Sequencing. PloS one. 2013;8:e80670.
22. Yeh K-M, Kurup A, Siu LK, Koh YL, Fung C-P, Lin J-C, et al. Capsular Serotype K1 or K2, Rather than <em>magA</em> and <em>rmpA</em>, Is a Major Virulence Determinant for <em>Klebsiella pneumoniae</em>; Liver Abscess in Singapore and Taiwan. Journal of Clinical Microbiology. 2007;45(2):466.
23. Amako K, Meno Y, Takade A. Fine structures of the capsules of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* K1. Journal of bacteriology. 1988;170 10:4960-2.
24. Kawai T. Hypermucoviscosity: an extremely sticky phenotype of *Klebsiella pneumoniae* associated with emerging destructive tissue abscess syndrome. Clin Infect Dis. 2006;42(10):1359-61.

25. Hansen DS, Mestre F, Albertí S, Hernández-Allés S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, et al. *Klebsiella pneumoniae* Lipopolysaccharide O Typing: Revision of Prototype Strains and O-Group Distribution among Clinical Isolates from Different Sources and Countries. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999;37(1):56.
26. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí VJ, Tomás JM. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infect Immun*. 1992;60(6):2529-35.
27. Chen J-H, Siu L, Fung C-P, Lin J-C, Yeh K-M, Chen T-L, et al. Contribution of outer membrane protein K36 to antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010;65:986-90.
28. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a Conserved Chromosomal Region Encoding *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae and Assessment of the Role of Fimbriae in Pathogenicity. *Infection and immunity*. 2009;77:5016-24.
29. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008;76(9):4055-65.
30. Murphy CN, Mortensen MS, Krogfelt KA, Clegg S. Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted into the Bladders of Mice as a Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infection and Immunity*. 2013;81(8):3009.
31. Donlan R. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging infectious diseases*. 2002;8:881-90.
32. Abdallah M, Benoliel C, Drider D, Dhulster P, Chihib NE. Biofilm formation and persistence on abiotic surfaces in the context of food and medical environments. *Archives of microbiology*. 2014;196(7):453-72.
33. Bandeira M, Carvalho P, Duarte A, Jordao L. Exploring Dangerous Connections between *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Healthcare-Associated Infections. *Pathogens*. 2014;3:720-31.
34. Wu M-C, Chen Y-C, Lin T-L, Hsieh P-F, Wang J-T. Cellobiose-Specific Phosphotransferase System of *Klebsiella pneumoniae* and Its Importance in Biofilm Formation and Virulence. *Infection and Immunity*. 2012;80(7):2464.

35. Stahlhut SG, Schroll C, Harmsen M, Struve C, Krogfelt KA. Screening for genes involved in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation using a fosmid library. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2010;59:521-4.
36. Boddicker J, Anderson R, Jagnow J, Clegg S. Signature-Tagged Mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* To Identify Genes That Influence Biofilm Formation on Extracellular Matrix Material. *Infection and immunity*. 2006;74:4590-7.
37. Bachman MA, Lenio S, Schmidt LA, Oyler JE, Weiser JN. Interaction of Lipocalin 2, Transferrin, and Siderophores Determines the Replicative Niche of *Klebsiella pneumoniae* during Pneumonia. *mBio*. 2012;3.
38. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infect Immun*. 2011;79(8):3309-16.
39. Russo T, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese L, Drake E, et al. Aerobactin Mediates Virulence and Accounts for the Increased Siderophore Production Under Iron Limiting Conditions by Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity*. 2014;82.
40. Ma L-C, Fang C-T, Lee C-Z, Shun C, Wang J-T. Genomic Heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* Strains Is Associated with Primary Pyogenic Liver Abscess and Metastatic Infection. *The Journal of infectious diseases*. 2005;192:117-28.
41. Hawkey P, Livermore D. Carbapenem antibiotics for serious infections. *BMJ (Clinical research ed)*. 2012;344:e3236.
42. Meletis G. Carbapenem resistance: Overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. 2015;3.
43. Naas T, Nordmann P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(16):7693-7.
44. Ah Y-M, Kim A-J, Lee J-Y. Colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014;44(1):8-15.
45. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Contemporary activity of colistin and polymyxin B against a worldwide collection of Gram-negative pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2006-09). *J Antimicrob Chemother*. 2011;66(9):2070-4.
46. Yanat B, Machuca J, Yahia RD, Touati A, Pascual Á, Rodríguez-Martínez JM. First report of the plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a clinical *Escherichia coli* isolate in Algeria. *Int J Antimicrob Agents*. 2016;48(6):760-1.

47. Wang Z, Qin R-R, Huang L, Sun L-Y. Risk Factors for Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection and Mortality of *Klebsiella pneumoniae* Infection. *Chinese Medical Journal*. 2018;131(1).
48. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(2):557-96.
49. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh T, Yi L-X, Zhang R, Spencer J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2015;16.
50. Richter SE, Miller L, Uslan DZ, Bell D, Watson K, Humphries R, et al. Risk Factors for Colistin Resistance among Gram-Negative Rods and *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9).
51. Matamoros S, Hattem J, Arcilla M, Willemsse N, Melles D, Penders J, et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*. 2017;7.
52. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: Here is the storm! *Trends in molecular medicine*. 2012;18:263-72.
53. Kalman D, Barriere SL. Review of the pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use of cephalosporins. *Texas Heart Institute journal*. 1990;17(3):203-15.
54. Watkins R, Papp-Wallace K, Drawz S, Bonomo R. Novel  $\beta$ -lactamase inhibitors: A therapeutic hope against the scourge of multidrug resistance. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:392.
55. Wiseman LR, Wagstaff AJ, Brogden RN, Bryson HM. Meropenem. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*. 1995;50(1):73-101.
56. Hamouda A, Findlay J, Amyes S. Carbapenems: Do they have a future. *Journal of medical microbiology*. 2011;60:1229-30.
57. Shah P, Isaacs R. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2003;52:538-42.
58. Toleman M, Spencer J, Jones L, Walsh T. bla<sub>NDM-1</sub> Is a Chimera Likely Constructed in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56:2773-6.
59. Marsik FJ, Nambiar S. Review of carbapenemases and AmpC-beta lactamases. *The Pediatric infectious disease journal*. 2011;30(12):1094-5.

60. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. Expert opinion on investigational drugs. 2002;11(4):529-44.
61. Bush K, Jacoby G. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2009;54:969-76.
62. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48(1):1-14.
63. Colodner R. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: A challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. American journal of infection control. 2005;33:104-7.
64. Mouton JW, Touzw DJ, Horrevorts AM, Vinks AA. Comparative pharmacokinetics of the carbapenems: clinical implications. Clinical pharmacokinetics. 2000;39(3):185-201.
65. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, et al. Comparative Review of the Carbapenems. Drugs. 2007;67(7):1027-52.
66. Sumita Y, Fukasawa M. Potent activity of meropenem against *Escherichia coli* arising from its simultaneous binding to penicillin-binding proteins 2 and 3. J Antimicrob Chemother. 1995;36(1):53-64.
67. Hayes MV, Orr DC. Mode of action of ceftazidime: affinity for the penicillin-binding proteins of *Escherichia coli* K12, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. J Antimicrob Chemother. 1983;12(2):119-26.
68. Dam V, Olrichs N, Breukink E. Specific Labeling of Peptidoglycan Precursors as a Tool for Bacterial Cell Wall Studies. Chembiochem : a European journal of chemical biology. 2009;10:617-24.
69. Papp-Wallace K, Endimiani A, Taracila M, Bonomo R. Carbapenems: Past, Present, and Future. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2011;55:4943-60.
70. Abbott I, Cerqueira G, Bhuiyan S, Peleg A. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: Laboratory challenges, mechanistic insights and therapeutic strategies. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11:395-409.
71. Watkins R, Bonomo R. Increasing prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and strategies to avert a looming crisis. Expert review of anti-infective therapy. 2013;11:543-5.
72. Marti S, Sanchez-Cespedes J, Alba V, Vila J. In vitro activity of doripenem against *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. International journal of antimicrobial agents. 2008;33:181-2.

73. Chahine EB, Ferrill MJ, Poulakos MN. Doripenem: a new carbapenem antibiotic. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2010;67(23):2015-24.
74. Mandell L. Doripenem: A New Carbapenem in the Treatment of Nosocomial Infection. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2009;49 Suppl 1:S1-3.
75. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M. New treatment option against gram-negative organisms. *Crit Care*. 2011;15:1-9.
76. Queenan A, Shang W, Flamm R, Bush K. Hydrolysis and Inhibition Profiles of  $\beta$ -Lactamases from Molecular Classes A to D with Doripenem, Imipenem, and Meropenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2009;54:565-9.
77. Oliver A, Levin BR, Juan C, Baquero F, Blázquez J. Hypermutation and the preexistence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* mutants: implications for susceptibility testing and treatment of chronic infections. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4226-33.
78. Lakshmi R, Nusrin K, Georgy S, Sreelakshmi K. Role of beta lactamases in antibiotic resistance: A review. *INTERNATIONAL RESEARCH JOURNAL OF PHARMACY*. 2014;5:37-40.
79. Birnbaum J, Kahan FM, Kropp H, Macdonald JS. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem/cilastatin. *The American Journal of Medicine*. 1985;78(6, Supplement 1):3-21.
80. Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. New developments in carbapenems. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(12):1102-11.
81. Schwaber M, Carmeli Y. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Potential Threat. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2009;300:2911-3.
82. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerging infectious diseases*. 2011;17:1791-8.
83. Cunha BA, Hamid N, Krol V, Eisenstein L. Safety of Meropenem in Patients Reporting Penicillin Allergy: Lack of Allergic Cross Reactions. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*. 2008;20:233-7.
84. Baughman RP. The Use of Carbapenems in the Treatment of Serious Infections. *Journal of Intensive Care Medicine*. 2009;24(4):230-41.
85. Bedenic B, Plecko V, Sardelić S, Uzunovic S, Godić Torkar K. Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria: Laboratory Detection and Clinical Significance. *BioMed research international*. 2014;2014:841951.

86. Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*. 2000;406:775-81.
87. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ.  $\beta$ -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8(5):525-33.
88. Armand-Lefèvre L, Angebault C, Barbier F, Hamelet E, Defrance G, Ruppé E, et al. Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(3):1488.
89. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56(1):20-51.
90. Eswaran J, Koronakis E, Higgins M, Hughes C, Koronakis V. Three's company: Component structures bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. *Current opinion in structural biology*. 2005;14:741-7.
91. Doumith M, Ellington M, Livermore D, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2009;63:659-67.
92. Pasterán FG, Méndez TL, Guerriero L, Rapoport M, Corso AC. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*. 2009;47 6:1631-9.
93. Cohen Stuart J, Leverstein-Van Hall MA. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(3):205-10.
94. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(3):440.
95. Jacoby G, Munoz-Price LS. The new beta-lactamases. *The New England journal of medicine*. 2005;352:380-91.
96. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*. 2009;9:228-36.
97. Giakkoupi P, Xanthaki A, Kanelopoulou M, Vlahaki A, Miriagou V, Kontou S, et al. VIM-1 Metallo-  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Greek Hospitals. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41:3893-6.
98. Walsh T, Weeks J, Livermore D, Toleman M. Dissemination of NDM-1 Positive Bacteria in the New Delhi Environment and Its Implications for Human Health: An Environmental Point Prevalence Study. *The Lancet infectious diseases*. 2011;11:355-62.

99. Khan A, Nordmann P. Spread of carbapenemase NDM-1 producers: The situation in India and what may be proposed. *Scandinavian journal of infectious diseases*. 2012;44:531-5.
100. Pitout J, Revathi G, Chow B, Muthoni B, Kariuki S, Nordmann P, et al. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from a large tertiary centre in Kenya. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2008;14:755-9.
101. Poirel L, Hombrouck-Alet C, Freneaux C, Bernabeu S, Nordmann P. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. *The Lancet Infectious diseases*. 2010;10(12):832.
102. Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic Features of blaNDM-1-Positive Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55:5403-7.
103. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes S. ARI 1:  $\beta$ -Lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 1993;2:81-7.
104. Mathers A, Hazen K, Carroll J, Yeh A, Cox H, Bonomo R, et al. First Clinical Cases of OXA-48-Producing Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "Menace" Arrives in the New World. *Journal of clinical microbiology*. 2012;51.
105. Poirel L, H  ritier C, Tol  n V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48:15-22.
106. Ma L, Wang J-T, Wu T-L, Siu L, Chuang Y-C, Lin J-C, et al. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLOS ONE*. 2015;10:e0139152.
107. Evans B, Amyes S. OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2014;27:241-63.
108. Hou C, Yang F. Drug-resistant gene of blaOXA-23, blaOXA-24, blaOXA-51 and blaOXA-58 in *Acinetobacter baumannii*. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2015;8:13859-63.
109. Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(2):477.

110. Gazin M, Paasch F, Goossens H, malhotra-kumar S. Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum-  $\beta$ -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50:1140-6.
111. Ho P-L, Wang Y, Wing-Sze Tse C, Fung KS-C, Cheng VC-C, Lee R, et al. Rapid Detection of Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae* by Use of a Modified Paper Strip Carba NP Method. *Journal of Clinical Microbiology*. 2018;56(1):e01110-17.
112. Lauretti L, Riccio M, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, et al. Cloning and Characterization of blaVIM, a New Integron-Borne Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene from a *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1999;43:1584-90.
113. Hrabák J, Chudáčková E, Papagiannitsis CC. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(9):839-53.
114. Nordmann P, Poirel L, Carrère A, Toleman M, Walsh T. How to detect NDM-1 producers. *Journal of clinical microbiology*. 2011;49:718-21.
115. Kempf M, Bakour S, Flaudrops C, Berrazeg M, Brunel JM, Drissi M, et al. Rapid detection of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *PLoS One*. 2012;7(2):e31676.
116. Mostachio A, Heidjen I, Rossi F, Levin A, Costa S. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo-  $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. *Journal of medical microbiology*. 2009;58:1522-4.
117. Liu W, Zou D, Li Y, Wang X, He X, Wei X, et al. Sensitive and Rapid Detection of the New Delhi Metallo-Beta-Lactamase Gene by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Journal of clinical microbiology*. 2012;50:1580-5.
118. Ohtsuka K, Yanagawa K, Takatori K, Hara-Kudo Y. Detection of *Salmonella enterica* in Naturally Contaminated Liquid Eggs by Loop-Mediated Isothermal Amplification, and Characterization of *Salmonella* Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(11):6730.
119. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annual review of genomics and human genetics*. 2008;9:387-402.
120. Bertelli C, Greub G. Rapid bacterial genome sequencing: Methods and applications in clinical microbiology. *Clinical microbiology and infection : the*

official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2013;36.

121. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack S. Review of Established and Innovative Detection Methods for Carbapenemase-Producing gram-negative Bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 2015;119.

122. Barisic I, Mitteregger D, Hirschl A, Noehammer C, Wiesinger-Mayr H. High diversity of beta-lactamases in the General Hospital Vienna verified by whole genome sequencing and statistical analysis. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. 2014;27.

123. Deraspe M, Alexander D, Xiong J, Ma J, Low D, Jamieson F, et al. Genomic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* PA96, the host of carbapenem resistance plasmid pOZ176. *FEMS Microbiology Letters*. 2014;356.

124. Ho P-L, Li Z, Lo S, Yam C, Lin C-H, Sham P-C, et al. Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying blaNDM-1 in Enterobacteriaceae isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. *Emerging Microbes & Infections*. 2012;1.

125. Benedict RG, Langlykke AF. Antibiotic activity of *Bacillus polymyxa*. *J Bacteriol*. 1947;54(1):24.

126. Ainsworth GC, Brown AM, Brownlee G. 'Aerosporin', an Antibiotic Produced by *Bacillus aerosporus* Greer. *Nature*. 1947;160(4060):263-.

127. Berglund N, Piggot T, Jefferies D, Sessions R, Bond P, Khalid S. Interaction of the Antimicrobial Peptide Polymyxin B1 with Both Membranes of *E. coli*: A Molecular Dynamics Study. *PLoS computational biology*. 2015;11:e1004180.

128. Michalopoulos A, Falagas ME. Colistin and polymyxin B in critical care. *Critical care clinics*. 2008;24(2):377-91, x.

129. Yu Z, Qin W, Lin J, Fang S, Qiu J. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. *BioMed Research International*. 2015;2015:679109.

130. Velkov T, Thompson PE, Nation RL, Li J. Structure–Activity Relationships of Polymyxin Antibiotics. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2010;53(5):1898-916.

131. Velkov T, Roberts K, Nation R, Thompson P, Li J. Pharmacology of polymyxins: New insights into an 'old class of antibiotics. *Future microbiology*. 2013;8:711-24.

132. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet* (London, England). 1997;349(9049):418-22.

133. Cajal Y, Rogers J, Berg OG, Jain MK. Intermembrane Molecular Contacts by Polymyxin B Mediate Exchange of Phospholipids. *Biochemistry*. 1996;35(1):299-308.
134. Clausell A, Garcia-Subirats M, Pujol M, Busquets MA, Rabanal F, Cajal Y. Gram-Negative Outer and Inner Membrane Models: Insertion of Cyclic Cationic Lipopeptides. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2007;111(3):551-63.
135. Imlay J. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nature reviews Microbiology*. 2013;11.
136. Kohanski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell*. 2007;130(5):797-810.
137. Cai Y, Lee W, Kwa AL. Polymyxin B versus colistin: an update. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(12):1481-97.
138. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012;10(8):917-34.
139. Shahbazi F, Dashti-Khavidaki S. Colistin: efficacy and safety in different populations. *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2015;8(4):423-48.
140. Dalfino L, Puntillo F, Mosca A, Monno R, Spada M, Coppolecchia S, et al. High-Dose, Extended-Interval Colistin Administration in Critically Ill Patients: Is This the Right Dosing Strategy? A Preliminary Study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;54:1720-6.
141. Batirel A, Balkan I, Karabay O, Agalar C, Akalın S, Alici O, et al. Comparison of colistin-carbapenem, colistin-sulbactam, and colistin plus other antibacterial agents for the treatment of extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* bloodstream infections. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*. 2014;33.
142. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Front Microbiol*. 2014;5:643.
143. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. . 2020.
144. Wang X, Quinn P. Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification. *Progress in lipid research*. 2009;49:97-107.

145. Boll J, Tucker A, Klein D, Beltran A, Brodbelt J, Davies B, et al. Reinforcing Lipid A Acylation on the Cell Surface of *Acinetobacter baumannii* Promotes Cationic Antimicrobial Peptide Resistance and Desiccation Survival. *mBio*. 2015;6:e00478-15.
146. Guo L, Lim KB, Poduje CM, Daniel M, Gunn JS, Hackett M, et al. Lipid A acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell*. 1998;95(2):189-98.
147. Bishop R, Gibbons H, Guina T, Trent M, Miller S, Raetz C. Transfer of palmitate from phospholipids to lipid A in outer membranes of Gram-negative bacteria. *The EMBO journal*. 2000;19:5071-80.
148. Petrou VI, Herrera CM, Schultz KM, Clarke OB, Vendome J, Tomasek D, et al. Structures of aminoarabinose transferase ArnT suggest a molecular basis for lipid A glycosylation. *Science (New York, NY)*. 2016;351(6273):608-12.
149. Gunn JS, Lim KB, Krueger J, Kim K, Guo L, Hackett M, et al. PmrA-PmrB-regulated genes necessary for 4-aminoarabinose lipid A modification and polymyxin resistance. *Molecular microbiology*. 1998;27(6):1171-82.
150. Lee J-Y, Ko KS. Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2013;78.
151. Beceiro A, Llobet-Brossa E, Aranda J, Bengoechea J, Doumith M, Hornsey M, et al. Phosphoethanolamine Modification of Lipid A in Colistin-Resistant Variants of *Acinetobacter baumannii* Mediated by the pmrAB Two-Component Regulatory System. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55:3370-9.
152. Cheng H-Y, Chen Y-F, Peng H-L. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of biomedical science*. 2010;17:60.
153. Trent MS, Ribeiro A, Lin SH, Cotter RJ, Raetz CRH. An inner membrane enzyme in *Salmonella* and *Escherichia coli* that transfers 4-amino-4-deoxy-L-arabinose to lipid A: Induction in polymyxin-resistant mutants and role of a novel lipid-linked donor. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:43122-31.
154. Stojanoski V, Sankaran B, Prasad BVV, Poirel L, Nordmann P, Palzkill T. Structure of the catalytic domain of the colistin resistance enzyme MCR-1. *BMC Biology*. 2016;14(1):81.
155. Hinchliffe P, Yang Q, Portal E, Young T, Li H, Tooke C, et al. Insights into the Mechanistic Basis of Plasmid-Mediated Colistin Resistance from Crystal Structures of the Catalytic Domain of MCR-1. *Scientific Reports*. 2017;7:39392.

156. Hu M, Guo J, Cheng Q, Yang Z, Chan E, Chen S, et al. Crystal Structure of *Escherichia coli* originated MCR-1, a phosphoethanolamine transferase for Colistin Resistance. *Scientific Reports*. 2016;6:38793.
157. Kim S-H, Jia W, Parreira V, Bishop R, Gyles C. Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157 : H7 and its association with PmrC. *Microbiology (Reading, England)*. 2006;152:657-66.
158. Arroyo L, Herrera C, Fernandez L, Hankins J, Trent M, Hancock R. The pmrCAB Operon Mediates Polymyxin Resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and Clinical Isolates through Phosphoethanolamine Modification of Lipid A. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2011;55:3743-51.
159. Beceiro A, Moreno-Flores A, Fernández N, Vallejo J, Aranda J, Adler B, et al. Biological Cost of Different Mechanisms of Colistin Resistance and Their Impact on Virulence in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2013;58.
160. Babinski K, Kanjilal S, Raetz C. Accumulation of the Lipid A Precursor UDP-2,3-diacylglucosamine in an *Escherichia coli* Mutant Lacking the lpxH Gene. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277:25947-56.
161. Falagas M, Rafailidis P, Matthaïou D. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2010;13:132-8.
162. Mell J, Redfield R. Natural Competence and the Evolution of DNA Uptake Specificity. *Journal of bacteriology*. 2014;196.
163. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, et al. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio*. 2017;8:e00543-17.
164. Arabaci C, Dal T, Başığit T, Genisel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and mcr-1 genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2019;13:504-9.
165. Vardakas KZ, Tansarli GS, Rafailidis PI, Falagas ME. Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bacteraemia due to Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(12):2793-803.
166. Aktaş Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy*. 2008;54(2):101-6.
167. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan ÖA, Feriha C, Cuzon G, et al. Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):1369.

168. İsmail Davarcı SŞ, Sebahat Aksaray, Mücahide Esra Koçoğlu, Mert Ahmet Kuşkucu, Mustafa Samastı. Molecular Epidemiology of Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates. *Anadolu Kliniği Tıp Bilimleri Dergisi*. 2019.
169. Crowley B, Benedí VJ, Doménech-Sánchez A. Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11):3679-82.
170. Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of  $\beta$ -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and Other  $\beta$ -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004;48(8):3203.
171. Neuner EA, Yeh JY, Hall GS, Sekeres J, Endimiani A, Bonomo RA, et al. Treatment and outcomes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;69(4):357-62.
172. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016;15.
173. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, Akin D, Yapislar H, Dilek AR, et al. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in Enterobacteriaceae isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:44.
174. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2017;17(2):153-63.
175. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Özhak Baysan B, et al. [Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2016;50(1):21-33.
176. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in Enterobacteriaceae strains. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 2015;28:1127-33.
177. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(2):809.
178. Yigit H, Queenan A, Rasheed J, Biddle J, Doménech-Sánchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-

Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase KPC-2. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2004;47:3881-9.

179. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J-P. Epidemiology of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean Countries. BioMed Research International. 2014;2014:305784.

180. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, et al. PCR Typing of Genetic Determinants for Metallo- $\beta$ -Lactamases and Integrases Carried by Gram-Negative Bacteria Isolated in Japan, with Focus on the Class 3 Integron. Journal of Clinical Microbiology. 2003;41(12):5407.

181. Aktaş Z, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2006;12:695-6.

182. 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 Journal of Microbiology. 2018;49(4):885-90.

183. Giacobbe DR, Del Bono V, Trecarichi EM, De Rosa FG, Giannella M, Bassetti M, et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a multicenter case–control–control study. Clinical Microbiology and Infection. 2015;21(12):1106.e1-.e8.

184. Hadjadj L, Baron SA, Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Co-occurrence of Variants of *mcr-3* and *mcr-8* Genes in a *Klebsiella pneumoniae* Isolate From Laos. Frontiers in Microbiology. 2019;10(2720).

185. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae*; Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2015;59(5):2780.

## 9. ÖZGEÇMİŞ



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



|                   |                    |                     |             |
|-------------------|--------------------|---------------------|-------------|
| <b>Adı</b>        | Neslihan           | <b>Soyadı</b>       | GENİŞEL     |
| <b>Doğum Yeri</b> | ADANA              | <b>Doğum Tarihi</b> | 05.05.1985  |
| <b>Uyruğu</b>     | T.C                | <b>Tel</b>          | 05416632768 |
| <b>E-posta</b>    | ngenisel@gmail.com |                     |             |

### EĞİTİM DÜZEYİ

|                             | Mezun Olduğu Kurumun Adı                | Mezuniyet Yılı |
|-----------------------------|-----------------------------------------|----------------|
| <b>Tezli Yüksek Lisans</b>  | -                                       |                |
| <b>Tezsiz Yüksek Lisans</b> | -                                       |                |
| <b>Lisans</b>               | ANKARA ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ | 2013           |
| <b>Lise</b>                 | Yozgat Şehitler Fen Lisesi              | 2003           |

### İŞ DENEYİMİ

| Görevi              | Kurum                                  | Süre (Yıl - Yıl) |
|---------------------|----------------------------------------|------------------|
| Araştırma Görevlisi | Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi | 2013-Halen       |

| Yabancı Dil Sınav Notu |        |       |           |           |           |     |     |     |
|------------------------|--------|-------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|-----|
| ÜDS/YDS                | YÖKDİL | IELTS | TOEFL IBT | TOEFL PBT | TOEFL CBT | FCE | CAE | CPE |
| 78                     |        |       |           |           |           |     |     |     |

|                   | Sayısal | Eşit Ağırlık | Sözel |
|-------------------|---------|--------------|-------|
| <b>ALES Puanı</b> | 85,38   | 85,87        | 71,51 |

## 10.EKLER

### 10.1. Etik Kurul Onayı

| DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK<br>ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU<br>DİCLE UNIVERSITY MEDICAL FACULTY ETHICS COMMITTEE FOR<br>NONINTERVENTIONAL STUDIES                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                   |                          |                                    |                               |      |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------|------|
| 56                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                   |                          |                                    |                               |      |
| KARAR                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                   |                          |                                    |                               |      |
| <p>Prof. Dr. Kadri GÜL, Doktora Öğrencisi Neslihan GENİŞEL, Dr. Öğr. Üyesi Nida ÖZCAN isimli araştırmacılar tarafından planlanan "Enterobacteriaceae izolatlarında karbapenem ve kolistin direnç mekanizmalarının moleküler olarak araştırılması" başlıklı araştırmaya <i>Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul'u</i> tarafından toplantıda hazır bulunan üyeler tarafından oy birliği ile onay verilmiştir.</p> <p>Klinik araştırma tamamlanıp yayın aşamasına geldiğinde, yayına sunulan bildiri veya makalenin bir örneğinin Etik Kurul'a verilmesi zorunludur.</p> |                   |                          |                                    |                               |      |
| DECISION                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                   |                          |                                    |                               |      |
| <p>The project titled as "Molecular investigation of carbapenem and colistin resistance mechanisms in enterobacteriaceae isolates" planned by Kadri GÜL, Neslihan GENİŞEL, Nida ÖZCAN has been approved by Ethics Committee of Dicle University Faculty of Medicine.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                   |                          |                                    |                               |      |
| Oturum No ( Meeting number ) :                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                   | Tarih (Date): 06.02.2020 |                                    | Saat (Hour): 14:00-15:00      |      |
| KURUL BAŞKANI (CHIEF)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                   | Prof. Dr. Meral ERDİNÇ   |                                    |                               |      |
| KURUL ÜYELERİ / MEMBERS                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                   |                          |                                    |                               |      |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | ÜNVANI            | ADI-SOYADI               | KURUMU                             | BRANŞI                        | İMZA |
| 1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Prof. Dr.         | Meral ERDİNÇ             | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Tıbbi Farmakoloji             |      |
| 2                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Prof. Dr.         | Aziz KARABULUT           | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Kardiyoloji                   |      |
| 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Prof. Dr.         | Zeynep BAYSAL YILDIRIM   | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Anesteziyoloji ve Reanimasyon |      |
| 4                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Prof. Dr.         | Ezeli AZARKAN            | Dicle Üniversitesi Hukuk Fakültesi | Öğretim Üyesi                 |      |
| 5                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Doç. Dr.          | M. Veysi BAHADIR         | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Genel Cerrahi                 |      |
| 6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Doç. Dr.          | Zülfükar YILMAZ          | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | İç Hastalıkları               |      |
| 7                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Doç. Dr.          | İbrahim KAPLAN           | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Tıbbi Biyokimya               |      |
| 8                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Doç. Dr.          | Mehmet Güli ÇETİNÇAKMAK  | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Radyoloji                     |      |
| 9                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | Dr. Öğretim Üyesi | İsmail YILDIZ            | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Biyoistatistik                |      |
| 10                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Dr. Öğretim Üyesi | Diclehan ORAL            | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Tıbbi Biyoloji                |      |
| 11                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | Dr. Öğretim Üyesi | Gülşay AYDOĞDU           | Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi   | Tıbbi Patoloji                |      |

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası Zemin Kat 21280 Kampüs/DİYARBAKIR  
Telefon:+90.412 . 248 80 01-16/4631 Faks:+90.412. 248 84 40 [kuruletikdiyar@gmail.com](mailto:kuruletikdiyar@gmail.com)

## 11.ORJİNALLİK RAPORU

|                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Turnitin Originality Report</b>                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                |
| Processed on: 2020年07月16日 13:08 +03<br>ID: 1358172123<br>Word Count: 24203<br>Submitted: 1                                                                                                                                                                        |                                                                                                |
| <b>KLEBSİELLA PNEUMONİAE<br/>İZOLATLARINDA KARBAPENEM VE<br/>KOLİSTİN DİRENÇ<br/>MEKANİZMALARININ MOLEKÜLER<br/>OLARAK ARAŞTIRILMASI</b> By Neslihan<br>Genişel                                                                                                   |                                                                                                |
| <b>Similarity Index</b><br><b>12%</b>                                                                                                                                                                                                                             | <b>Similarity by Source</b><br>Internet Sources: 5%<br>Publications: 4%<br>Student Papers: 10% |
| 3% match (student papers from 09-Jul-2018)<br><a href="#">Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2018-07-09</a>                                                                                                                                                     |                                                                                                |
| 1% match (Internet from 03-Aug-2019)<br><a href="https://jdc.org/index.php/journal/article/download/11048/2078/">https://jdc.org/index.php/journal/article/download/11048/2078/</a>                                                                               |                                                                                                |
| 1% match (student papers from 08-Jun-2019)<br><a href="#">Submitted to Dicle University on 2019-06-08</a>                                                                                                                                                         |                                                                                                |
| 1% match (student papers from 25-Jun-2019)<br><a href="#">Submitted to Erciyes Üniversitesi on 2019-06-25</a>                                                                                                                                                     |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 12-Dec-2019)<br><a href="#">Submitted to Alanya Alaaddin Keykubat Üniversitesi on 2019-12-12</a>                                                                                                                                  |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 09-May-2019)<br><a href="#">Submitted to İzmir Katip Çelebi Üniversitesi on 2019-05-09</a>                                                                                                                                        |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 29-Aug-2019)<br><a href="#">Submitted to The Scientific &amp; Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) on 2019-08-29</a>                                                                                                |                                                                                                |
| < 1% match (Internet from 08-Feb-2014)<br><a href="http://klinikmikrobiyoloji2013.org/DUYURU_2_web.pdf">http://klinikmikrobiyoloji2013.org/DUYURU_2_web.pdf</a>                                                                                                   |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 06-Aug-2017)<br><a href="#">Submitted to Akdeniz University on 2017-08-06</a>                                                                                                                                                     |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 30-May-2018)<br><a href="#">Submitted to Konya Necmettin Erbakan University on 2018-05-30</a>                                                                                                                                     |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 12-Jul-2010)<br><a href="#">Submitted to University of Liverpool on 2010-07-12</a>                                                                                                                                                |                                                                                                |
| < 1% match (student papers from 30-Jul-2019)<br><a href="#">Submitted to Dicle University on 2019-07-30</a>                                                                                                                                                       |                                                                                                |
| < 1% match (Internet from 14-May-2019)<br><a href="http://www.ankaramikrobiyoloji.org.tr/docs/Kolistin_direnci_dun_bugun_yarin_AMD_2018_Seminerleri.pdf">http://www.ankaramikrobiyoloji.org.tr/docs/Kolistin_direnci_dun_bugun_yarin_AMD_2018_Seminerleri.pdf</a> |                                                                                                |