



**B R ÜN VERS TE HASTANES NDE KARBAPENEM D RENÇL  
KLEBS ELLA PNEUMON AE SU LARINDA KARBAPENEM D RENÇ  
GENLER N N MOLEKÜLER ANAL Z VE SU LARIN KLONAL  
L K S**

---

**UZMANLIK TEZ**

**Dr. Hülya ÖZDEM R**

**TEZ DANI MANI  
Prof. Dr. Yusuf YAKUPO ULLARI**

**MALATYA 2017**

## TE EKKÜR

E itimimde ve asistanlık süresince destek ve yardımlarını gördü üm tez danı manım saygıde er hocam Prof.Dr.Yusuf Yakupo ulları'na, tez çalı mam süresince yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr.Barı Otlu'ya ve yeti memde emekleri geçen Prof.Dr.H. brahim Özerol, Prof.Dr.Çi dem Kuzucu, Prof.Dr.Selma Ay, Prof.Dr.M.Sait Tekereko lu'na te ekkür ederim.



## Ç NDEK LER

TE EKKÜR.....	
Ç NDEK LER.....	i
TABLolar L STES .....	iv
EK LLER L STES .....	v
KISALTMALAR.....	vi
1.G R VE AMAÇ.....	1
2.GENEL B LG LER.....	3
2.1.Tarihçe ve taksonomi.....	3
2.2.Biyokimyasal özellikleri.....	5
2.3.Kültürde üretilmesi.....	6
2.4.Patogenez ve virulans faktörleri.....	6
2.4.1.Adhezinler.....	7
2.4.1.1.Tip 1 Fimbria.....	7
2.4.1.2.Tip 3 Fimbria.....	7
2.4.1.3.Kpc Fimbria.....	8
2.4.1.4.KPF 28 Adhezin.....	8
2.4.2.Kapsüler polisakkaritler.....	8
2.4.2.1.Kapsüler polisakkarit sentezi.....	8
2.4.2.2.Fagositoza direnç.....	10
2.4.2.3.Erken inflamatuvar cevabın engellenmesi .....	10
2.4.2.4.Antimikrobiyal peptidlere kar ı direnç.....	10
2.4.2.5.Dendritik hücre maturasyonunun engellenmesi.....	11
2.4.3.Lipopolisakkaritler.....	11
2.4.3.1.O antigeni.....	11
2.4.3.2.Kor polisakkariti.....	12
2.4.3.3.Lipid A.....	12
2.4.4.Demir tutan sistemler (Sideroforlar).....	12
2.4.5.Dı membran proteinleri.....	13

2.4.5.1.Omp A.....	13
2.4.5.2.D <sub>1</sub> membran porinleri.....	13
2.4.5.3.Effluks pompası.....	13
2.5.Klebsiella pneumonia'nın yaptığı enfeksiyonlar.....	13
2.6.Tedavi.....	14
2.6.1. Klebsiella penumoniae'da karbapenem direnç mekanizmaları.....	17
2.6.1.1. D <sub>1</sub> membranda permeabilitede görevli porinlerde azalma veya kayıp.....	17
2.6.1.2.Effluks mekanizmasıyla antibiyotiğin dışarı atılması.....	18
2.6.1.3.Amp C laktamazların veya ESBL'lerin fazla üretilmesi.....	19
2.6.1.4.Karbapenemaz üretilmesi.....	19
2.6.1.4.1.Sınıf A karbapenemazlar.....	19
2.6.1.4.2.Sınıf C metallo laktamazlar.....	20
2.6.1.4.3.Sınıf D karbapenemazlar.....	21
2.7. Klebsiella pneumoniae'da görülen karbapenem direncinin güncel durumu.....	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1.Kültür ve bakterilerin tanımlanması.....	27
3.2.Antimikrobiyal duyarlılık testleri.....	31
3.2.1.Modifiye hodge testi.....	33
3.2.2. mipenem E-test ile M K de erlerinin tesbiti.....	33
3.3.Genotipik yöntemlerle karbapenemaz direnç genlerinin tesbiti.....	33
3.3.1.DNA izolasyonu (Eksraksiyon).....	33
3.3.2.Polimeraz zincir reaksiyonu.....	34
3.3.3.PZR reaksiyonunun agaroz jel elektroforezi.....	35
3.4. Su ların genotipik ilikilerinin saptanması.....	36
3.4.1. zolatların hazırlanması.....	36
3.4.2. zolatların agarozda gömülmesi.....	36
3.4.3.Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması.....	36
3.4.4.Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması.....	37
3.4.5.Agaroz kalıpların içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi.....	37

<b>3.4.6.Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi.....</b>	<b>37</b>
<b>3.4.7.Elektroforez.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4.8.Sonucun gözlenmesi ve analizi.....</b>	<b>38</b>
<b>4.BULGULAR.....</b>	<b>39</b>
<b>4.1.Karbapenem direnç genleri.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.Su ların klonal ili kisi: PFGE sonuçları.....</b>	<b>42</b>
<b>5.TARTI MA.....</b>	<b>45</b>
<b>6. KAYNAKLAR.....</b>	<b>53</b>
<b>7. ÖZET.....</b>	<b>68</b>
<b>8. ABSTRACT.....</b>	<b>70</b>

## TABLULAR İÇİNE

Tablo Adı	Açıklama	SayfaNo
Tablo 1	<i>Klebsiellae</i> taksonomisi	4
Tablo 2	<i>Klebsiella</i> ve <i>Raoultella</i> cinsi türler arası biyokimyasal farklılıklar	5
Tablo 3	Karbapenem dirençli <i>K.pneumoniae</i> enfeksiyonlarında tedavi algoritması	16
Tablo 4	<i>K.pneumoniae</i> 'nin CLSI (2015) karbapenem duyarlılık sınırları	32
Tablo 5	PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler	32
Tablo 6	<i>K.pneumoniae</i> suşlarının örnek tipi ve klinik dağılımı	39

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Ekil Adı	Açıklama	Sayfa No
ekil 1	<i>K.pneumoniae</i> 'nin elektronmikroskopik görüntüsü	4
ekil 2	<i>Klebsiella spp.</i> 'de virulans faktörleri	6
ekil 3	<i>K.pneumoniae</i> 'nin immün cevaptan kaçış yolları	9
ekil 4	Gram negatif hücre duvarı ve karbapenem direnç mekanizmaları	17
ekil 5	Acr AB effluks sisteminin tematik yapısı	18
ekil 6	KPC üreten izolatların dünyada coğrafik dağılımı	23
ekil 7	NDM üreten izolatları dünyada coğrafik dağılımı	24
ekil 8	OXA-48 üreten izolatların dünyada coğrafik dağılımı	25
ekil 9	Modifiye Hodge testi	33
ekil 10	Karbapenem dirençli <i>K.pneumoniae</i> suşlarında OXA-48 geni varlığı	40
ekil 11	Karbapenem dirençli <i>K.pneumoniae</i> suşlarında NDM geni varlığı	41
ekil 12	Karbapenem dirençli <i>K.pneumoniae</i> suşlarında VIM geni varlığı	41
ekil 13	Suşların imipenem MİK değerlerinin dağılımı	42
ekil 14	<i>K.pneumoniae</i> suşlarının PFGE görüntüsü	43
ekil 15	<i>K.pneumoniae</i> suşlarının dendrogram görüntüsü	44

## **KISALTMALAR**

**ESBL:** Extended spectrum beta-lactamase

**MS-HA:** Mannoos sensitiv hemaglutinasyon

**MR/K-HA:** Mannoos rezistans Klebsiella hemaglutinasyon

**TLR:** Toll like reseptör

**hBD:** Human beta defensin

**MKP:** Mitojen aktif protein kinaz fosfataz

**DH:** Dendritik hücre

**Omp:** Outer membran protein

**SXT:** Trimetoprim-sulfametoksazol

**M K:** Minimum inhibitör konsantrasyon

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**MHT:** Modifiye Hodge testi

**PFGE:** Pulsed field jel elektroforezi

**PBP:** Penisilin ba layan protein

**PZR:** Polimeraz zincir reaksiyonu

**MBL:** Metallo- -laktamaz

**µL:** Mikrolitre

**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases

**VIM:** Verona integron-encoded MBL

**OXA:** Oksasilinaz beta laktamaz

**NDM:** New Delphi metallo betalaktamaz

**IMP:** Imipenem beta laktamazlar



## 1.G R VE AMAÇ

Antibiyotiklere karşı geli en bakteriyel direnç tüm dünyada artan ve yayılan global bir sorundur. Çoklu ilaç direnci olan patojenlerin dünyada özellikle yoğun bakım ünitelerinde yayılması tıp çevrelerinde kaygı uyandırmaktadır. Çoklu ilaç direnci olan patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlar sonucunda tedavi maliyeti artmakta, hastanede kalı süresi uzamakta ve buna ba lı olarak morbidite ve mortalite oranları da yükselmektedir (1). Özellikle Gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların ço almasıyla birlikte bu bakterilerde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geli mesi, yeni ve etkin antibiyotiklerin geli tirilmemesi bilim çevrelerinde endi eyle kar ılanmaktadır.

Karbapenemler sıklıkla Gram negatif bakterilerin sebep olduğu ciddi enfeksiyonlarda tercih edilmektedirler. Geni spektrumlu olmalarının yanı sıra yan etkilerinin fazla olmaması her ya ta hastada ve ek sorunları olan hastalarda da güvenle kullanılabilmesi tercih sebebi olmaktadır. Aynı zamanda Gram negatif bakterilerin di er laktam antibiyotiklere karşı direnç geli tirmek için ürettikleri laktamazlar tarafından hidroliz edilmemeleri özellikle dirençli Gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlarda kullanım alanlarını geni letmi tir.

Son yıllarda Gram negatif bakterilerde karbapenem direnci yaygın bir eilde görölmektedir. Karbapenem direnci öncelikle *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'de görölmekle birlikte son yıllarda *Enterobacteriaceae* ailesinde, sıklıkla *Klebsiella pneumoniae* ve *E.coli* olmak üzere di er üyelerinde de görölmektedir (2). Son on yılda karbapenem direncinden ESBL ve Amp C laktamazların fazla üretilmesiyle birlikte porin kayıplarının sorumlu olduğu dü ünölmektedir. Bununla birlikte karbapenemazların, *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenem direncinde daha önemli rol oynadı ı gösterilmi tir (3).

*K.pneumoniae* da antibiyotik direnci 1980'lerin ba ından itibaren artarak günümüze kadar gelmi tir. *K.pneumoniae* 'nın sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılan sefolosporinlere, penisilinlere, florokinolonlara, trimetoprim-sulfametoksazol ve aminoglikozitlere direnç geli mesiyle son tercih olarak karbapenemler kullanılmaya ba lanmı tir (4). Günümüzde *K.pneumoniae*'da karbapenem direnci ciddi boyutlara ula mı bulunmaktadır. *K.pneumoniae* 'da görülen karbapenem direnci çe itli mekanizmalarla olu makla birlikte di er *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi baskın olarak karbapenemaz üretilmesi sorumludur. *K. pneumonia* 'da çe itli laktamazlar, özellikle Amp C enzimleri ile permeabilite defektlerinin birlikte bulunması zayıf karbapenem direncine

neden olmakla birlikte bakteride karbapenem hidrolizi yapan karbapenemazların üretilmesi permeabilite defektleri olmadan da yüksek düzeyde karbapenem direncine yol açmaktadır (5). Moleküler özelliklerine göre Ambler sınıflandırması A, B ve D sınıflarına ayrılan karbapenemazların, etki spektrumları, inhibisyon özellikleri, endemik da ılımı ve moleküler epidemiyolojik yayılımı da çe itlilik göstermektedir (5).

Ülkemizde ve dünyada hızla yayılan ve toplum sa lı ını tehdit eden bir antimikrobiyal direnç mekanizması olan karbapenem direnci yaygınla maktadır. Bu çalı mada, merkezimizde tanımlanmı olan karbapenem dirençli *K.pneumoniae* su larında, direncin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve dirençli su lar arasındaki klonal da ılımın saptanması amaçlanmı tır.



## 1.GENEL B LG LER

### 2.1.Tarihçe ve Taksonomi

*Enterobacteriaceae* ailesinin üyesi olan *Klebsiella pneumoniae* bu ailenin genel özelliklerine sahiptir. Hareketsiz, sporsuz, polisakkarit yapıda kapsülü olan Gram negatif basillerdir. Kısa ve uçları yuvarlak, 1-2 µm eninde ve 0.5-0.8 µm boyunda büyüklü e sahiptirler. Bu bakteriler aerop veya fakültatif anaerop özellik gösterebilir; 37 °C’de ve pH 7’de iyi ürerler. Do ada yaygın olarak bulunabilen bu bakteri kurulu a dirençli olup oda sıcaklı ında aylarca, 4 °C’de ise haftalarca canlı kalabilir.

‘*Klebsiella*’ ismi 19.yüzyılın sonlarında Alman mikrobiyolog Edwin Klebs tarafından verilmi tir. İlk *Klebsiella* türü rinoskleramalı bir hastadan izole edilmi ve daha sonra *Klebsiella rhinoscleromatis* olarak isimlendirilmi tir.

Abel, ozenalı hastaların burun sekresyonlarından izole etti i kapsüllü basilleri, “*Bacillus mucosus ozaenae*” olarak tanımlamı tir. Daha sonra bu bakteri *Klebsiella* cinsine dahil edilerek *K. ozaenae* olarak isimlendirilmi tir.

*Klebsiella pneumoniae*, Carl Friedlander tarafından ilk defa 1882 yılında pnömoniden ölen bir hastanın akci erinden izole edilmi ve uzun yıllar ‘Friedlander basili’ olarak tanımlanmı tir.

Drancourt ve arkadaş ları, 2001’de 16S rRNA sekans analizi ve bakteriyel RNA polimerazın subünitini kodlayan *rpoB* geninin analizi ile dokuz *Klebsiella* türü tanımlamı tir (6). Kökenlerine göre üç kümeye ayrılmı , daha sonra *Klebsiella* cinsi iki küme altında toplanmı tir (Tablo 1). Bunlar;

-*Klebsiella*

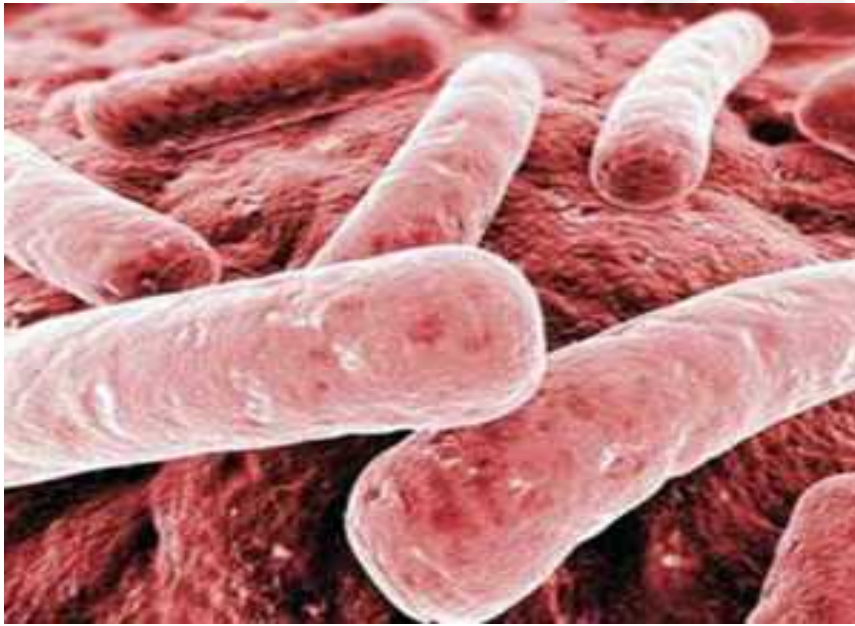
-*Raoultella*

Birinci kümede ve üçüncü kümede yer alan türler *Klebsiella* cinsinde yer alırken, ikinci kümedeki türler *Raoultella* cinsine dahil edilmi tir.

Tablo 1. *Klebsiellae* Taksonomisi (6)

<i>Klebsiellae</i>
<i>Klebsiella granulomatis</i>
<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subs. <i>Pneumoniae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subs. <i>Ozaenae</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subs. <i>Rhinoscleromatis</i>
<i>Raoultella ornithinolytica</i>
<i>Raoultella planticola</i>
<i>Raoultella terrigena</i>

Morfolojik olarak kısa ve uçları yuvarlak olarak görülen bakterinin elektron mikroskopisindeki görüntüsü ekil 1’de gösterilmiştir.



ekil 1. *Klebsiella pneumoniae*'nin elektronmikroskopik görüntüsü (7)

## 2.2.Biyokimyasal Özellikleri

*Klebsiella* cinsi, biyokimyasal özelliklerine göre identifiye edilmektedir. Gram negatif, hareketsiz, kapsüllü basillerdir. Bu cinsteki bakterilerin a a ıda belirtilen biyokimyasal özellikleri mevcuttur;

- Simmons sitrat ve potasyum siyanid broth'da ürerler.

- Hidrojen sülfid olu turmazlar.

- Metil red negatif, Voges Proskauer pozitifdir.

- Ornitin dekarboksilaz bulundurmaz ve ornitinden dekarboksilat olu turmazlar (8).

- *Klebsiella* cinsindeki birçok su ve *Raoultella* üreyi yava hidrolize ederek, Christen's üre agarda açık pembe bir renk olu tururlar. Triptofandan indol olu umunda *K. pneumoniae* türü indol negatif iken *K. oxytoca* indol pozitifdir (6). *Klebsiella* ve *Raoultella* cinsi bakterilerin türleri arasındaki biyokimyasal farklılıkları Tablo 2'de gösterilmi tir (6).

Tablo 2. *Klebsiella* ve *Raoultella* cinsi türler arası biyokimyasal farklılıklar

Biyokimyasal Özellik	<i>K.pneumoniae</i> subs. <i>pneumoniae</i>	<i>K.pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K.pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromats</i>	<i>K.oxytoca</i>	<i>R. ornithinolytica</i>	<i>R. planticola</i>	<i>R. terigana</i>
ndol	-	-	-	+	+	D	-
Metil red	-	+	+	D	+	+	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	D	+	+
Üreaz	+	-	-	+	+	+	-
Lizin	+	D	-	+	+	+	+
Ornitin	-	-	-	-	+	-	D
ONPG	+	D	-	+	+	+	+
Malonate	+	-	+	+	+	+	+
Üreme ısısı							
5°C	-	-	-	-	+	+	+
10°C	-	-	-	+	+	+	+
42°C	+			+	+	+	-

D: De i ken olabilir.

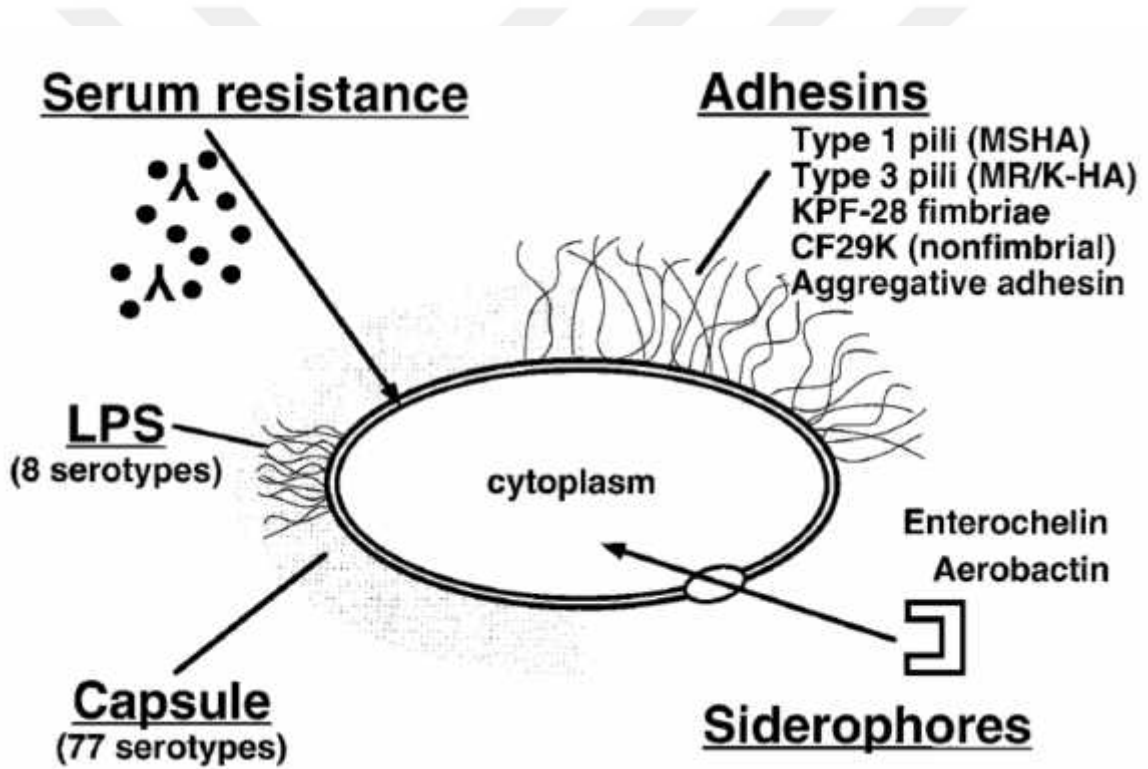
### 2.3.Kültürde Üretilmesi

*Klebsiella* cinsi kültür plaklarında büyük ve mukoid koloni yaparlar. MacConkey agarda büyük, mukoid, kırmızı koloni yapar, laktozu fermente eder ve asit olu tururlar (6).

### 2.4.Patogenez ve Virulans Faktörleri

*Klebsiella* patogenezinden bakterinin yapısında bulunan dört komponent önemli ölçüde sorumludur; adhezinler, kapsüler polisakkaritler, lipopolisakkaritler ve demir tutucu sistemler olan sideroforlar.

*Klebsiella* patogenezinden sorumlu komponentler ekil 2’de gösterilmi tir.



ekil 2. *Klebsiella* virulans faktörleri (9)

### 2.4.1.Adhezinler

Mikroorganizmaların mukozal ve epitelyal hücrelere adhezyonu, kolonizasyon ve enfeksiyon geli iminde ilk basamaktır. Bakterilerde hemaglutininler ço unlukla adhezin olarak görev yapmaktadır ve sıklıkla bakteri hücrelerinin yüzeyinde çıkıntı olu turmu fimbrialar üzerinde lokalizedir (10).

#### 2.4.1.1.Tip 1 fimbria

*Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* su ları di er *Enterobacteriaceae* üyelerindekilerle de benzer olarak, tip 1 fimbrialara sahiptir. *Klebsiella* tip 1 fimbrialar, D-Mannoza duyarlı hemaglutinasyondan (MS-HA) sorumludur ve kobay eritrositlerini hemaglutine etmektedir. Klinik izolatlardaki *Klebsiella pneumoniae* su larının %80'den fazlası ve *Klebsiella oxytoca* su larının büyük kısmı tip 1 fimbria eksprese etmektedir (10). Klinik numunelerden ve fekal ta ıyıcılardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae* su larında tip 1 fimbria ekspresyonuna çevresel izolatlardan daha fazla rastlanmaktadır (10). Tip 1 fimbria geni *fim* gen kümesinde lokalizedir (11). Tip 1 fimbrialar oluklu, kalın ve dı membrandan yüzeye do ru ipliksi uzantılar eklindedirler. Tekrarlayan Fim A subünitlerinden ve adhezin Fim H molekülünden olu mu tur (11). *Klebsiella* tip 1 fimbria, Fim H molekülü aracılı ıyla konak hücrelerinde veya ekstraselüler matrikste mannoz içeren yapılara adhezyonu sa lamaktadır (12). Özellikle, üroepitelyal hücrelere daha duyarlı oldu u için idrar yolu enfeksiyonlarının geli mesinde önemli rol oynamaktadır (13).

#### 2.4.1.2.Tip 3 fimbria

Tip 3 fimbrialar, ince, oluksuz, 2-4 nm geni li inde, 0.5-2 µm uzunlu undadır. Tanninle muamele edilmi eritrositleri aglutine etmektedir ve mannoz dirençli hemaglutinasyon yapmaktadır. İlk olarak *Klebsiella* su larında bulundu u için, mannoz dirençli *Klebsiella* hemaglutinasyon, (MR/K-HA) olarak adlandırılmı tır. Tip 3 fimbrialar *mrk* operonunda kodlanmı tır ve bu gen kümesi kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilmektedir (14). Tip 3 fimbrianın polimerize helikal yapısını olu turan ve cansız yüzeylere kar ı afinitesini artıran fimbrial subünit, *mrk A* geninde kodlanmı tır (15). Kollajene ba lanmayı sa layan fimbrial subünit ise fimbrianın uç kısmında yer alır ve *mrk F* geninde kodlanmı tır (16). Tip 3 fimbrianın di er önemli fonksiyonu, *K. pneumoniae*'nin biofilm formasyonu olu turarak canlı veya cansız yüzeylere ba lanmasında önemli rol almasıdır (15). Bakterilerin endotelial hücrelere ve mesane epitel hücrelerine ba lanmasında da tip 3 fimbriaların önemli rolü vardır

(17). Üriner katetere ba lı idrar yolu enfeksiyonlarının olu masında tip 3 fimbrianın aracılık etti i biofilm olu umunun önemli rolü vardır (18).

### **2.4.1.3.Kpc fimbria**

Kpc fimbrianın sentezi, *Kpc ABCD* operon gen bölgesi tarafından yönetilir ve bu operon aynı zamanda *K.pneumoniae* 'da biofilm olu umunda da rol oynamaktadır (19).

### **2.4.1.4.KPF 28 adhezin**

KPF 28 adhezin, 28 kDa büyüklü ünde bir polimerdir.2-4 nm eninde, 0.5-2 µm uzunlu unda, kalın ve esnek bir fimbriadır (20). KPF 28 majör subünitinin sentezinde görevli olan gen, *CAZ-5/SHV-4* beta laktamaz geninin bulundu u R plazmidinde kodlanmı tır. *K. pneumoniae*'nın insan karsinoma hücrelerine (Caco-2) adhezyonunda KPF28'in sorumlu oldu u saptanmı tır. Bu da KPF 28'in memelilerdeki barsak kolonizasyonundan sorumlu faktör olabilece ini dü ündürmektedir (21).

## **2.4.2.Kapsüler Polisakkaritler**

*Klebsiella* su ları kalın, hidrofilik, polisakkarit bir kapsülle çevrenmi lerdir. Bu kapsül, bakteri kolonilerinin plakta parlak ve mukoid görünmesine sebep olmaktadır. Kapsül, eker ünitelerinin tekrarlanmasıyla olu an, asidik polisakkarit yapıdadır. *Klebsiella* türlerinde antijenik olarak 77 farklı ekzopolisakkarit tanımlanmı tır (22).

### **2.4.2.1.Kapsüler polisakkarit sentezi**

Gram negatif bakterilerde kapsüler polisakkaritlerin yapıta mını olu turan glukon sentezinde üç farklı yolak tanımlanmı tır. *K. pneumoniae*'nın kapsüler polisakkariti sentezinde *Wzy*'ye ba lı polimerizasyon yolu kullanılmaktadır. Bu yol en net biçimde *E. coli*'de kapsüler polisakkarit grup 1' de tanımlanmı tır (23). Kapsüler polisakkarit sentezinin kodlandı ı *Cps* gen kümesi, eker nükleotidlerinin sentezinde ve tekrarlayan ünitelerinin sentezi, birle tirilmesi ve ta nınmasında görevlidir (24). *K. pneumoniae*'da ki *cps* gen kümesi, 21-30 kb büyüklü ünde olup 16-25 gen içermektedir. 5' terminal bölgesi sırasıyla altı gen (*galF*, *orf2*, *wzi*, *wza*, *wzb* ve *wzc*) içerir. 3' terminal bölgede *gnd* geni bulunmaktadır. Merkezi bölgelerde ise protein polimerizasyonunda ve kapsüler polisakkarit subünitelerinin birle tirilmesinde görevli genler mevcuttur. *Wzy* ve *wzi* genleri *K pneumoniae*'nın tüm serolojik (K antijeni; kapsül antijeni) tiplerinde bulunmakla birlikte yapılan sekans analizlerinde farklı K tipleri için de i kenlik gösterirler. *Wzy* geni hedefli PZR testleri ile K1, K2, K3, K5, K20, K54 ve K57

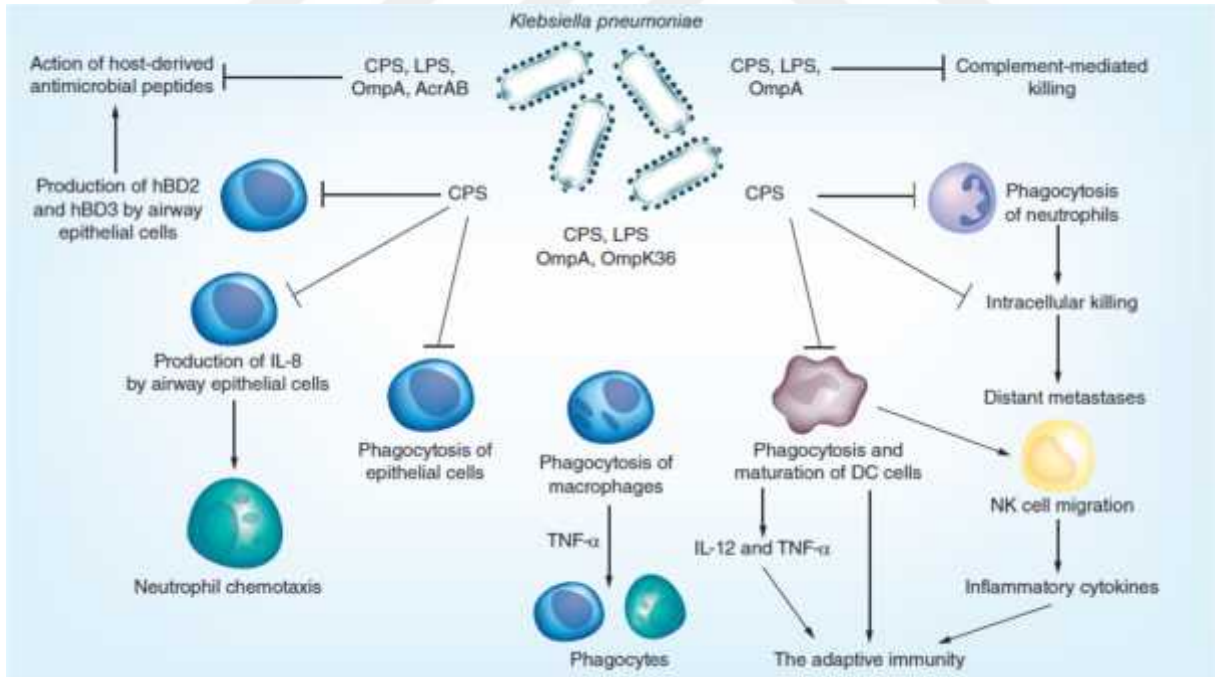


identifiye edilmiştir. *Wzi* gen sekans analizi ise çoğunlukla klinik olarak tesbit edilen *Klebsiella* izolatlarının K tiplerinin ayırımında kullanılmaktadır (25). *Wzc* gen sekans analizi ise *K.pneumoniae*'da yeni kapsül tiplerinin tespiti için araştırılmaktadır (26).

Kapsül polisakkarit sentezi, tekrarlayan ekster ünitelerinin çiftli glikoziltransferazlar tarafından birleştirilmesiyle meydana gelmektedir (27). Oluşturulan kapsül, flippaz *Wzx* ile iç membrandan periplazmik aralığa geçirilmekte ve periplazmik aralıkta *Wzy* polimeraz ile polimerize edilmektedir (27). Polimerizasyon kontrolü ve matür kapsül polisakkaritin bakteri hücre yüzeyine çıkartılması çiftli enzimlerin kontrolü altındadır ve bu mekanizma *Wza* (iç membran tirozin otokinaz), *Wzb* (protein tirozin fosforaz), *Wzc* (integral dış membran lipoprotein) enzimlerinin kombinasyonu ile gerçekleştirilmektedir (27).

Kapsül polisakkarit, *K.pneumoniae*'nin konak immün yanıtından kaçmasında da önemli rol oynamaktadır.

*K.pneumoniae*'nin konak immün yanıtından kaçma mekanizmaları ekil 3'de gösterilmiştir.



ekil 3. *Klebsiella pneumoniae*'nin immün cevaptan kaçma yolları (28).

#### **2.4.2.2. Fagositoza direnç**

*Klebsiella pneumoniae*'nin yüzeyi saran kalın bir kapsülü olması onu opsonizasyondan ve makrofajların (29), nötrofillerin (30), epitelyal hücrelerin (31) ve dendritik hücrelerin (32) fagositozundan korumaktadır. Hipervirulan *K.pneumoniae* su ları, virulan olmayan su lara kıyasla daha düşük düzeyde makrofajlarla etkileşim içerisindedir (33). Kapsül antijenine göre K1 tip *Klebsiella pneumoniae* su ları, nötrofiller tarafından fagosite edildikten sonra da intraselüler bakteri öldürme mekanizmalarından kaçarak daha uzak alanlara yerle ebilmektedir (33).

#### **2.4.2.3. Erken inflamatuvar cevabın engellenmesi**

Havayolu epitel hücrelerindeki Toll-like reseptörleri (TLR), patojenleri tanıyarak çeşitli antimikrobisallerin, insan defensinlerin (hBD), sitokinlerin ve kemokinlerin salınmasını sağlamaktadır. Çeşitli yolların aktivasyonu ile üretilen sitokin ve kemokinler inflamatuvar hücrelerin kemotaksisinde ve inflamatuvar cevap oluşturmalarını sağlarlar. Kapsüllü wild tip *K. pneumoniae* su larına karşı konakta erken immün cevap oluşturmazken, kapsüler polisakkariti mutant avirulan su lara karşı konakta kuvvetli inflamatuvar cevap oluşturmaktadır. Kapsüler polisakkaritin inflamatuvar mekanizmayı engellemesi, interleükin 8 (IL8) salınımını inhibe etmesi ve bunun sonucunda TLR 2 ve TLR 4 sinyallerinin salınımının inhibe olmasıyla gerçekleşmektedir (34,35).

#### **2.4.2.4. Antimikrobiyal peptidlere karşı direnç**

Antimikrobiyal peptidlere karşı direnç, kapsüler polisakkarit aracılığıyla olmaktadır. *K. pneumoniae*'nin kapsüler polisakkariti bakteriyi konaktan salınan antimikrobiyal polipeptidlere karşı korumaktadır ve bakteri yüzeyinden salınan serbest kapsüler polisakkaritler de antimikrobiyal polipeptidleri tutarak bunların bakteri yüzeyine ulaşma imkanını azaltmaktadır (36). Respiratuvar sistemde, subletal antimikrobiyal polipeptid konsantrasyonlarında, bakteri *cps* gen ekspresyonunu artırarak bu polipeptidlere karşı kendini korumaktadır (37). İnsan beta defensinler (hBD), havayolu epitel hücreleri tarafından üretilen kuvvetli antimikrobiyal peptidlerdir, hBD1 yapısal olarak belli miktarda düzenli olarak üretilmesine rağmen, hBD2 ve hBD3 ise patojenler ve sitokinler tarafından indüklendiğinde salgılanmaktadır (38,39). *K. pneumoniae*'ya bağlı haldeki kapsüler polisakkarit TLR cevabını engelleyerek hBD2 ve hBD3 salınımını azaltmaktadır ve hBD salınımında negatif regülatör olan mitojen aktif protein kinaz fosfataz (MKP-1) salınımını stimüle etmektedir (40).

#### **2.4.2.5.Dendritik hücre (DH) maturasyonunun engellenmesi**

*Klebsiella pneumoniae* kapsüler polisakariti, dendritik hücrelerin maturasyonunu engelleyerek immatür DH oluşumuna yol açmaktadır. İmmatür DH oluşumu IL-12 ve TNF- $\alpha$  üretiminin azalmasına neden olur. Bunun sonucunda immün yanıt oluşmasında T lenfositlere antijen sunulmasında önemli rol oynayan dendritik hücrelerin fonksiyonları bozulur. Aynı zamanda naturel killer hücre migrasyonunda azalmaya yol açar (32).

Konak immün yanıtına ait birçok mekanizmayı engelleyerek kendisi için uygun ortamı hazırlayabilen bakteri daha kolay çoğalabilmektedir (32).

#### **2.4.3.Lipopolisakkaritler**

*K. pneumoniae* kapsülünü oluşturan lipopolisakkaritler, üç parçadan meydana gelir. Büyük oranda koruyucu ve hidrofobik olan lipid A dışı membrana bağlıdır. Değişken O-antijeni lipopolisakkarit tabakasının dış kısmında bulunmaktadır. Koruyucu polisakariti ise O-antijeni ile lipid A arasında yer almaktadır (41).

##### **2.4.3.1.O-antijeni**

*K. pneumoniae*'de O- antijeninin 9 farklı grubu tanımlanmıştır; O1, O2, O2ac, O3, O4, O5, O7, O8 ve O12 (41). O- antijeninin biyosentezinde görevli enzimler altı gen den oluşan *wb* gen kümesi tarafından yönetilmektedir. Bu kümede *wzm*, *wzt*, *wbbM*, *glf*, *wbbN* ve *wbbO* genleri yer almaktadır. Bu gen kümesi bakteri kromozomunda koruyucu bir bölgede olmasına karşın genetik varyasyon gösterebilmektedir, bunun sonucunda kimyasal varyasyonları farklı O- antijenleri ortaya çıkmaktadır (42). Klinik olarak izole edilen *K. pneumoniae* suşlarında sıklıkla O1 serotipine rastlanmaktadır (41). Hipervisköz suşlarda da daha sık olarak O1 serotipi görülmektedir (42). O- antijeni bakterideki komplemanı aktive eden yapıların komplemanla karşılaşmasını engellenmektedir. Böylelikle bakteri kompleman aracılı ölümüne karşı koruyucu olmaktadır (43). *K. pneumoniae*'nin O- antijeni eksik olan suşlarında da kapsüler polisakaritin bakteriyi komplemana karşı koruyabildiği gösterilmiştir (44,45).

### 2.4.3.2.Kor polisakkariti

*K. pneumoniae*'da iki tip kor polisakkariti mevcuttur. Kor polisakkaritlerinin sentezi *wa* gen kümesi tarafından yönetilmektedir (46). Hipermükovisköz *K. pneumoniae* su larında tip 2 kor polisakkarit daha sık saptanmaktadır (47). Yapılan çalı malarda bakteri virulansında tip 2 kor polisakkaritin tip 1'e göre daha etkili oldu u gösterilmi tir (46). Hayvanlar üzerinde yapılan çalı malarda, lipopolisakkarit sentetaz enziminin sentezinden sorumlu gendeki mutasyon sonucu bakterinin kolonizasyon yapma yetene inde büyük ölçüde azalma oldu u görülmü tür. Bundan dolayı idrar yolu enfeksiyonu olu turma kapasitesinin önemli ölçüde dü tü ü tespit edilmi tir (48).

### 2.4.3.3.Lipid A

Lipid A sentezi bakterinin sitoplazmasında yapısal enzimlerce sentezlenerek, çe itli transport mekanizmalarıyla dı membrana ta ınmakta ve dı membrana ba lanmaktadır. Lipid A'nın ta ınması esnasında modifikasyon enzimleri ile kovalent modifikasyon gerçekleştirilmektedir. Lipid A'nın modifikasyonu, konak do al immünesine, özellikle antimikrobiyal peptidlere kar ı direnç geli iminde önemli rol oynamaktadır. Modifikasyon enzimlerinde olu an mutasyonlar *K. pneumoniae*'nin virulansında azalmaya yol açmaktadır (49,50). Lipid A ve kor polisakkaridinin fare alveolar makrofajlarında fagositoza kar ı dirençte de rol oynadı ı gösterilmi tir (45).

### 2.4.4.Demir yakalama (Sideroforlar)

Demir bakterinin hem *in vivo* hem de *in vitro* ço alması için gereklidir. *K. pneumoniae*'da 12 farklı demir tutucu sistem tespit edilmi tir. Bunlar dört sınıfa ayrılır; Fe<sup>+2</sup> transporter Feo, ABC transporter, hemofor ve siderofor up-take sistemleri. Bakteriyel patojenler konakta ba lı halde bulunan demiri kullanabilmek için küçük molekül a ırlıklı demir elatörleri sentezlemektedir. Bunlara hemofor, siderofor ismi verilmektedir. Bu sideroforlardan *K. pneumoniae*'da bulunanı enterobaktindir. Enterobaktinin demire afinitesi di er elatörlere göre daha yüksektir. Konak do al immünesi sideroforların etkisini bloke etmek için lipokolin 2 sekrete etmektedir (51). Böylelikle bakterinin ço alması engellenmi olmaktadır. Hipervirulan *K. pneumoniae*'larda di er klasik tipteki *K. pneumoniae*'lara göre kantitatif olarak daha fazla ve daha aktif siderofor sekrete edildi i görülmü tür (52).

## 2.4.5. Dı Membran Proteinleri

### 2.4.5.1. OmpA

Omp A Gram negatif bakterilerde majör dı membran proteindir. Kapsüler polisakkaritten ba ımsızdır ve havayollarında epitel aracılı inflamatuvar cevabın önlenmesinden sorumludur (45). OmpA eksikli i *K. pneumoniae*'nın antimikrobiyal peptidlere duyarlılı ını artırmaktadır (53). Aynı zamanda alveolar makrofajların fagositozuna kar ı dirençten de sorumludur (45).

### 2.4.5.2. Dı membran porinleri

*K. pneumoniae*'da iki majör dı membran proteini, OmpK35 ve OmpK36 mevcuttur. Bu porinler aracılı ıyla, hidrofilik moleküller, besin maddeleri ve sefalosporinler, karbapenemler gibi ilaçlar bakteri içerisine geçebilmektedir (54). *K.pneumoniae* bu porinlerin yoklu unda kompensatuar olarak KpnO (55) ve OmpK26 (56) gibi farklı porinler de eksprese edebilmektedir. Hayvanlar üzerinde yapılan çalı malarda, OmpK36, KpnO, OmpK26 yoklu unda sefalosporinlere ve karbapenemlere direncin arttı ı fakat bakteri virulansının azaldı ı saptanmı tır. Tek ba ına OmpK35 eksikli inin antibiyotik direnci ve bakteri virulansı üzerine etkisinin olmadı ı görülmü tür. OmpK36 eksikli inin hem antibiyotik direncini artırdı ı hem de bakterinin nötrofiller tarafından fagositozunda artmaya neden olarak bakteri virulansını negatif yönde etkiledi i gösterilmi tir (54).

### 2.4.5.3. Effluks pompası

*K. pneumoniae*, sıklıkla AcrAB tip effluks pompasını eksprese etmektedir. Effluks pompası hem kinolonlar ve beta laktamlar, hem de konak kaynaklı antimikrobiyal peptidlerin atılmasında görev almaktadır. AcrAB effluks sistemi aynı zamanda bakterinin kona ın do al immün sistemine kar ı direncinde de rol oynamaktadır (57).

## 2.5. *Klebsiella pneumoniae*'nin Yaptı ı Enfeksiyonlar

*Klebsiella* cinsi *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yer alan, çevreden de izole edilebilen saprofit mikroorganizmalardır. Bu cinsin insanlarda olu turdu u enfeksiyonların % 70'inden *K. pneumoniae* sorumludur (58). *K. pneumoniae* gastrointestinal sistemde, deride ve nazofarinksde kolonizedir. Nekrotizan pnömoni, piyojenik karaci er absesi, endojen endoftalmit gibi ciddi toplum kaynaklı enfeksiyonlara sebep olmaktadır (59,60).

*K. pneumoniae*, 1970'lerden itibaren hastane kaynaklı enfeksiyonlarda mühim rol oynamaktadır. Özellikle dü kün, alkolik hastalar risk grubundadır.

drar yolu enfeksiyonu: *K.pneumoniae*, idrar yollarında herhangi bir patoloji olmayan sa lıklı ki ilerde de enfeksiyon sebebi olmaktadır. drar yolu enfeksiyonuna ba lı bakteriyemi geli en hastalarda *E.coli*'den sonra ikinci en sık enfeksiyon etkenidir (61). *K. pneumoniae*'ya ba lı geli en idrar yolu enfeksiyonlarında izlenen klinik özellikler di er bakteriyel patojenlerle olu an enfeksiyonlardan farklı de ildir (61).

Pnömoni: *K. pneumoniae*'nın sebep oldu u pnömoni bazı özellikleri sebebiyle ve ilk bulan ki iye yapılan atıfla 'Friedlander hastalı ı' olarak isimlendirilmi tir. Tipik *K. pneumoniae* pnömonisinin özellikleri; hastalı ın iddetli seyretmesi, alkolik hastalarda sık görülmesi, özellikle alt lobları tutması, kırmızı jöle ekinde hemoptizi olması, ödematöz lobar konsolidasyona ba lı radyografik olarak fissürlerin belirginle mesi ve abse olu ması olarak sayılabilmektedir. Fakat bu klinik bulgular tek ba ına tanı için yeterli olmamaktadır. Yapılan balgam kültürlerinde anaerobik etkenlerin de bu klinik bulgulara sebep oldu u gösterilmi tir (6).

Karaci er absesi: *K. pneumoniae*'nın sebep oldu u toplum kaynaklı karaci er absesi özellikle Asya kökenlilerde daha sık görülmektedir. Özellikle K1 serotipi karaci er abselerinde daha sık izole edilmektedir (62).

*K. pneumoniae*'ya ba lı yara enfeksiyonları, hepatobiliyer enfeksiyonlar, kateter enfeksiyonları, bakteriyemi, menenejit, peritonit, endoftalmit olu abilmektedir (63).

## 2.6.Tedavi

*Enterobacteriaceae* ailesi intestinal floranın önemli üyelerindendir. Aynı zamanda hastane kaynaklı ve toplum kaynaklı enfeksiyonların olu masında da rol oynamaktadır. Bu bakteriler insanlar arasında ellerle, kontamine yiyecek ve sular yoluyla veya çevresel kaynaklarla kolayca yayılabilmektedir (64).

*K. pneumoniae*'nın sebep oldu u enfeksiyonların tedavisi, antibiyotiklere direncin ortaya çıkmasıyla özellikle 1980'lerden itibaren komplike bir hal almı tır. Sefalosporinler, florokinolonlar, Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) sıklıkla *K. pneumoniae*'nın neden oldu u toplum kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere kar ı son yıllarda direnç geli mesiyle ampirik tedavide ba arısızlık artmı tır (65). Kullanılan ilaçlara

direncin geli mesiyle nozokomiyal enfeksiyonlarda da tercih edilen antibiyotikler de i mi tir (65,66). Yapılan bazı surveyans çalı malarında, *K. pneumoniae*'nin %20-80 oranında birinci ku ak sefalosporinlere, florokinolonlara ve aminoglikozidlere dirençli oldu u gösterilmi tir (67,68). Çoklu ilaç direncinde, plazmidler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elemanlar önemli rol oynamaktadır. Plazmidlerin, transpozon ve integronların yayılması ve kromozomal mutasyonların olu masıyla toplum kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonlarında tedavi seçenekleri azalmı tır. Geçen yıllarda, sıklıkla kullanılan florokinolonlara da direncin geli mesiyle son tercih olarak karbapenemler kullanılmaya ba lanmı tır (69,70). Ancak, karbapenem direncinin de yaygınla masıyla birlikte farklı tedavi protokolleri uygulanmaya ba lanmı tır. Karbapenem grubu antibiyotikler ile birlikte yüksek doz tigesiklin, kolistin veya aminoglikozid grubu antibiyotikler kullanılarak kombinasyon tedavileri uygulanmaktadır. Çoklu ilaç direnci görülen *K.pneumoniae*'nin sebep oldu u ciddi enfeksiyonlarda kombinasyon tedavi protokolleri uygulanırken daha basit ve lokalize kalan enfeksiyonlarda monoterapi tercih edilmektedir (66).

Enfeksiyon bölgesine göre tercih edilen antibiyotikler çe itlilik göstermektedir. Tablo 3'de enfeksiyonların yerle im alanına göre ilk tercih edilen ve ikincil olarak kullanılabilen antibiyotikler gösterilmektedir (71).

Tablo 3. Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* enfeksiyonlarında antibiyotik tedavisi algoritması (71)

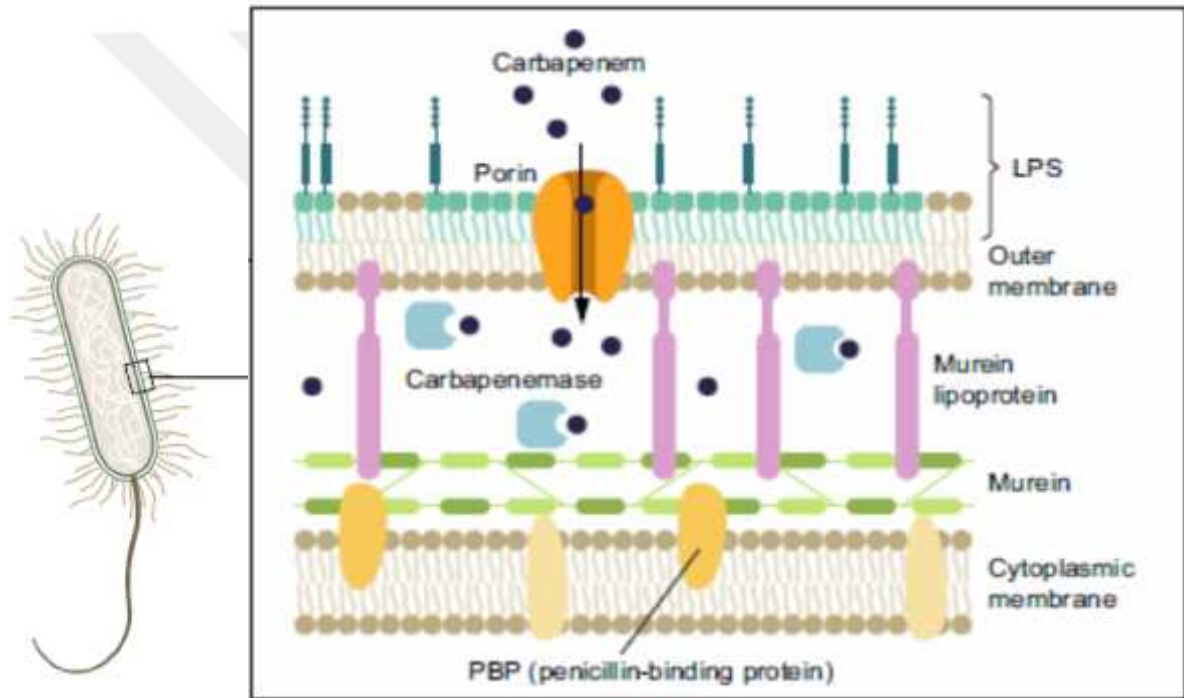
Enfeksiyon bölgesi	Birinci tercih antibiyotikler	İkinci tercih antibiyotikler	
Kanyolu	-Yüksek doz meropenem/doripenem -Ve polimiksin B	-Aminoglikozid -Tigesiklin -Fosfomisin -Rifampin	Meropenem/doripenem: M K 16 µg/mL ise yüksek doz devam edilir
Akciğer	-Yüksek doz meropenem/doripenem -Ve polimiksin B	-Tigesiklin -Aminoglikozid -Fosfomisin -Rifampin	M K > 16 µg/mL ise in vitro duyarlı alternatif antibiyotik verilir Polimiksin B/ kolistin: M K 2 µg/mL ise devam edilir
Gasrointestinal sistem/ bilier trakt	-Yüksek doz meropenem/doripenem -Ve polimiksin B -Ve yüksek doz tigesiklin	-Fosfomisin -Rifampin	M K > 2 µg/mL ise in vitro duyarlı alternatif antibiyotik verilir
drar	-Yüksek doz meropenem/doripenem -Ve fosfomisin -Veya aminoglikozid	-Kolistin -Aminoglikozid	Tigesiklin: M K 1 µg/mL devam edilir.M K > 1 µg/mL in vitro duyarlı alternatif antibiyotik verilir Aminoglikozid:M K 2 µg/mL gentamisin/ tobramisin ve 4 µg/mL amikasin ise aminoglikozid tercih edilir.M K > 2 µg/mL gentamisin/ tobramisin > 4 µg/mL amikasin in vitro duyarlı antibiyotik



### 2.6.1. *Klebsiella pneumoniae*'da Karbapenem Direnç Mekanizmaları

Karbapenem grubu antibiyotikler, laktam sınıfı antibiyotiklerdendir. Yapısal olarak da bu sınıftakilere benzer olup laktam halkasının 1.pozisyonunda sülfür atomu yerine karbon atomu içermektedirler. Diğer laktam grubu antibiyotiklere göre daha geniş spektrumludur (72). Karbapenemler, Gram negatif ve Gram pozitif aerob ve anaeroblara etkilidir (73). Penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe etmek yoluyla bakterisidal etki gösterirler. Diğer laktam grubu antibiyotiklere göre, ESBL ve Amp-C laktamazların hidrolizine daha dayanıklıdır (72).

Gram negatif basillerde karbapenem direnç mekanizmaları ekil 4'de gösterilmiştir.



ekil 4.Gram negatif basil hücre duvarı ve karbapenem direnç mekanizmaları (74).

Geçen son on yılda karbapenem grubu antibiyotiklere de hızla direnç gelişmiştir. *K. pneumoniae* 'da karbapenemlere karşı çeşitli mekanizmalarla direnç görülebilmektedir (74).

#### 2.6.1.1. Dış membranda permeabilitede görevli porinlerde azalma veya kayıp

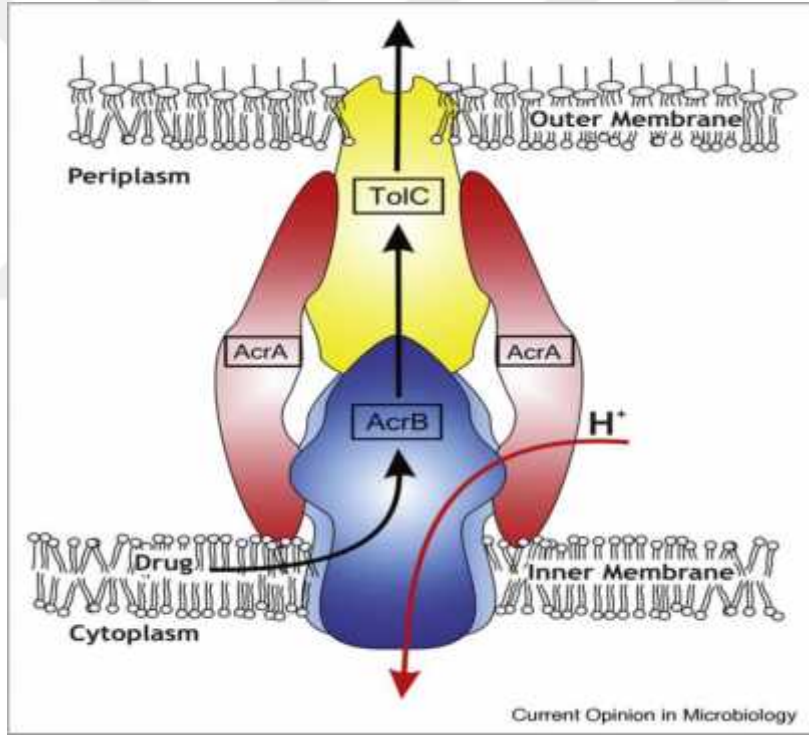
OmpK35 ve OmpK36 porinlerinde azalma veya kayıp karbapenemlerin MİK değerlerindeki artışla birlikte (75,76). Karbapenem kullanımı, *K. pneumoniae* mutantlarının oluşumunu

tetikleyerek majör dış membran porinleri olan OmpK35 ve/veya OmpK36 'nın kaybına yol açabilmektedir. Bununla birlikte *OmpK36* gen ekspresyonunda azalma karbapenem direncinde *OmpK35* gen ekspresyonundaki azalmadan daha önemlidir. Porinlerdeki azalma veya kayıp, laktamazlar kadar karbapenem direncinde etkili değildir (77).

### 2.6.1.2.Effluks mekanizmasıyla antibiyotiğin dışarı atılması

Yapılan çalışmalarda, *K. pneumoniae*'da effluks mekanizması ile ilacın etkin konsantrasyona ulaşması engellenerek direnç görüldüğü rapor edilmiştir (78).

*K.pneumoniae*'da karbapenem direncinde rol oynayan AcrAB effluks sistemi ekil 5'te gösterilmiştir.



ekil 5.Acr AB effluks sisteminin yapısı (79).

Çoklu ilaç dirençli *K. pneumoniae* izolatlarındaki major effluks sistemi AcrAB/ToIC mekanizmasıdır (80). Bu mekanizmanın, karbapenem grubu antibiyotiklere karşı duyarlılığın azalmasında önemli rolü olduğu tespit edilmiştir (81).

### 2.6.1.3.Amp C laktamazların veya ESBL'lerin fazla üretilmesi

Çe itli ESBL enzimleri ve Amp C enzimlerinin fazla salınımı porin defektleriyle birlikte karbapenem direncine yol açmaktadır. Özellikle ESBL enzimlerinden CTX-M ve Amp C enzimlerinden DHA-1 karbapenem direnci olan su larda daha sık tespit edilmektedir. Bu enzimler tek ba larına karbapenem hidrolizine yol açmamakla birlikte porin defektleri ve effluks pompası ile beraber karbapenem direncine yol açmaktadır. Bu etki özellikle ertapenem üzerinde sıklıkla görülmektedir (83).

### 2.6.1.4.Karbapenemaz üretilmesi

Ambler sınıflamasında; laktamazlar, aminoasit sekans homolojisine göre dört sınıfa (A, B, C, D) ayrılmı tır. A, C ve D sınıfı laktamazlarda aktif bölgelerinde serin aminoasidi bulunmakta; B sınıfı laktamazlarda ise (metallo laktamazlar) aktif bölgelerinde çinko bulunmaktadır (82). *K. pneumoniae*'nin üretti i karbapenemazlar, A, B ve D sınıfı içerisinde yer almaktadır (83).

#### 2.6.1.4.1.Sınıf A Karbapenemazlar

İlk karbapenemaz 1993 yılında *Enterobacter cloacae*'da (NmcA; non-metallo-carbapenemase of class A) tanımlanmıştır (84).

Daha sonra SME enzimleri (*Serratia marcescens* enzimleri) tanımlanmıştır. Bu enzimlerde be varyant (SME-1,SME-5) tespit edilmiştir ve bu enzimin sentezinden sorumlu gen bölgesi bakteri kromozomunda kodlanmıştır (84).

IMI enzimleri (imipenem hidrolize eden enzimler) ilk olarak *Enterobacter spp.*'de tanımlanmıştır. Bu karbapenemazları kodlayan genler ço unlukla kromozomaldır. Fakat IMI-2 varyantı çevresel bir bakteri olan *Enterobacter asburiae* su larında plazmid kaynaklı olarak bulunmuştur (85).

GES-1 (Guinea extended spectrum laktamaz) enzimi karbapenemazdır, ilk olarak 2000'de rapor edilmiştir. GES ailesinin 24 varyantı tanımlanmıştır (85). Tüm GES varyantları sefolosporinleri hidrolize etmektedir (86). Sadece GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 ve GES-18 imipenemi hidroliz etmektedir (87).

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) enzimleri sınıf A karbapenemazlar içerisinde yer almaktadır. Ço unlukla *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır ve yüksek seviyede direnç

ile birlikte. İlk KPC-2 pozitif *K. pneumoniae* 1996'da Birleşik Devletler'de tespit edilmiştir (88). Bugüne kadar 30 varyant tanımlanmış olup dünyada en yaygın görülenler ise KPC-2 ve KPC-3 varyantıdır (89). Hem KPC-2 hem de KPC-3 üretebilen *K. pneumoniae* klonu ST 258 yaygın olarak görülmektedir (90).

Son yıllarda KPC, *E. coli*, *Enterobacter cloacae* ve *P. aeruginosa* gibi diğer türlerde de görülmekle beraber daha sık olarak *K. pneumoniae*'de izlenmektedir (91).

KPC enzimleri, penisilinler, karbapenemler, sefalosporinler, sefamisinler ve aztreonamı hidroliz etmekte; klavulanik asit, tazobaktam, boronik asit ve avibaktam gibi laktamaz inhibitörlerine karşı dirençlidirler (91).

Çeşitli KPC üreten *K. pneumoniae* klonları farklı sekans tiplerini barındırmaktadır. Konjugatif plazmidler üzerinde lokalize transpozon (*Tn4401*)'da *bla*KPC genleri bulunmakta ve horizontal yayılımı sağlamaktadır (92). Bu özellik, enzime daha fazla yayılma kapasitesi sağlamaktadır. *Tn4401*, 10 kb uzunluğundadır ve *Tn3* transpozonun *tnpA* geni, *Tn3* resolvaz geni (*tnpR*), iki insersiyon sekans ünitesini; *ISKpn6* ve *ISKpn7*'i içermektedir (93).

KPC enzimini bulandıran *K. pneumoniae* suşları çoğunlukla, idrar yolu enfeksiyonları, pnömoni, septisemi, intraabdominal enfeksiyonlar gibi nosokomial enfeksiyonlarda izole edilmektedir, daha az sıklıkla toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (91).

#### **2.6.1.4.2. Metallo Laktamazlar (MBL)**

Ambler sınıflamasına göre B grubu enzimlerdir. MBL'lar birçok çevresel ve fırsatçı bakteri türlerinde tanımlanmıştır. MBL'lardan *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık tespit edilen, VIM, IMP ve NDM enzimleridir (94).

IMP tip laktamazlar ilk tanımlanmış MBL'dır. Klinik olarak önemli Gram negatif basillerde; *Enterobacteriaceae* ailesindeki birçok bakteride ve *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'de tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinde ilk olarak, IMP-1 1991'de *S. marcescens*'de Japonya'da izole edilmiştir. Daha sonra çok sayıda IMP varyantı tespit edilmiştir. Bugünümüzde bu sayı 48'i bulmuştur. Bununla birlikte IMP sıklığı, KPC, VIM, NDM ve OXA-48'den daha azdır (94).

VIM (Verona integron-encoded MBL): VIM-1 ilk olarak 1997'de İtalya'da (95,96), daha sonra VIM-2 *P. aeruginosa*'da Fransa'dan rapor edilmiştir (97). VIM ailesinin 41 varyantı

vardır ve ço unlu u *P. aeruginosa*'da izole edilmi tir. VIM-2 daha yaygın olarak görölmektedir (98).

KHM-1 laktamaz ilk olarak 1997'de Japonya'da, *C. freundii*'de izole edilmi tir (99). GIM-1 (German imipenemaz) MBL ilk olarak Almanya'da *P. aeruginosa*'da identifiye edilmi tir. Daha sonra *Escherichia coli*, *C. freundii* ve *K. oxytoca*'da da identifiye edilmi tir. Di er tanımlanan MBL'lar (SPM-1, SIM-1, DIM-1, TMB-1 ve AIM-1) *Enterobacteriaceae*'da tesbit edilmemi fakat *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'de bulunmu tur (99).

Klinik olarak önemli MBL'dan biri olan NDM (New Delhi MBL) *K. pneumoniae*'da 2009'da sveç'te Hindistan'dan gelen bir hastada rapor edilmi tir. NDM-1 yapısal olarak di er MBL'lardan daha fazla VIM-1/VIM-2'ye benzemektedir. Bugüne kadar 10'dan fazla varyantı saptanmı tir (100). Direnç patenleri incelendi inde NDM laktamazların; plazmid aracılı AmpC sefalosporinazlar, klavulanik asidi inhibe eden ESBL'ler, di er tip karbapenemazlar (OXA-48, VIM ve KPC tipleri), aminoglikozid direnç enzimleri (16S RNA metilaz), kinolonaz (Qnr), makrolidaz (esteraz), rifampisin (rifampisin modifiye edici enzim) gibi pek çok direnç mekanizmalarıyla beraber bulunabildi i gösterilmi tir (98,99). Böylelikle NDM üreten *K.pneumoniae* su ları birçok farklı antibiyotik grubuna dirençli bulunmaktadır. Sıklıkla kolistin ve tigesikline duyarlıdırlar (101).

#### **2.6.1.4.3.Sınıf D Karbapenemazlar**

Sınıf D laktamazlar (oksasilinazlar, OXA) içerisinde 400'den fazla enzim bulunmaktadır ve bu enzimlerin bazı varyantları karbapenemleri hidrolize etmektedir (102). Oksasilinaz enzimlerinin ender görülen bazı varyantları, OXA-163 gibi, sefalosporinleri çok zayıf veya hiç hidrolize etmemektedir. Tüm sınıf D laktamazlar zayıf karbapenemaz aktivitesine sahiptir. Permeabilite defektleri gibi di er faktörlerle birlikte karbapenem direncine neden olmaktadır (103).

Ço u D sınıfı laktamaz varyantları; *Acinetobacter*'de, OXA-48 varyantları ise *Enterobacteriaceae* ailesinde tanımlanmı tir (104). İlk OXA-48, 2001'de Türkiye'de bir *K. pneumoniae* su unda tanımlanmı tir (105).

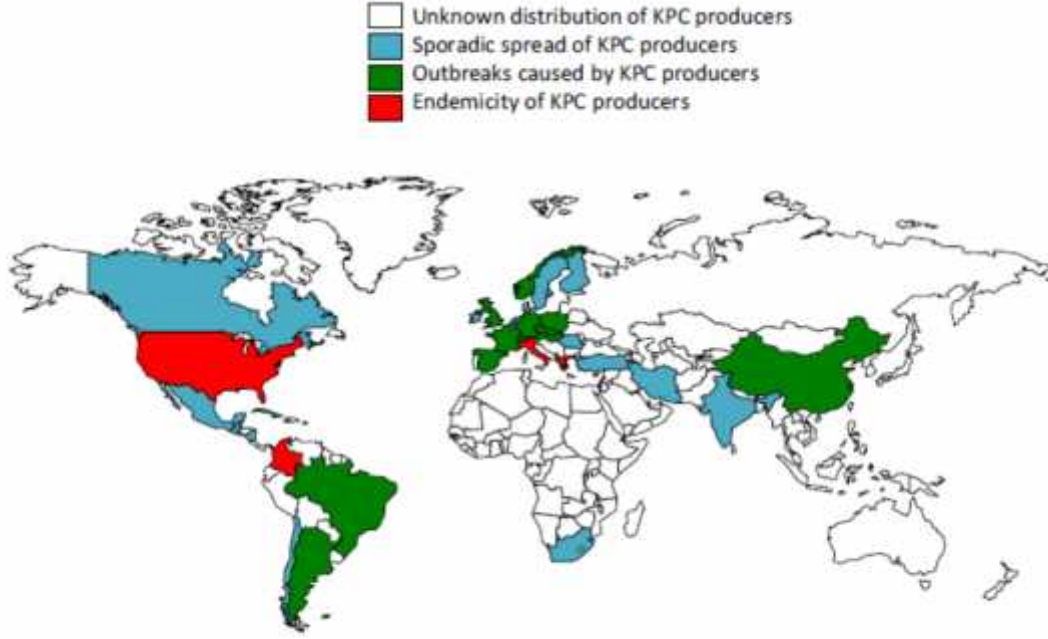
OXA-48 enzimi tüm dünyada sık rastlanan bir beta laktamazdır. Penisilinleri hidroliz etmekle birlikte karbapenemlere, geni spektrumlu sefalosporinlere (3.ku ak sefalosporinler ) ve aztreonama kar ı aktivitesi zayıftır (102). Bununla birlikte ESBL (CTX-15) veya Amp C enzimleri ile birlikte bulundu unda karbanemlere kar ı artmı direnç saptanmı tir. Bu enzim

aktivitesi EDTA veya klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmaz fakat in vitro ko ullaarda NaCl ile inhibe olmaktadır. OXA-48 ile yapılan ara tırmalar sonucunda plazmidlerde olan transpozon Tn1999 veya transpozon Tn1999.2 ile transfer edilebildi i gösterilmi tir (106).

## **2.7. *Klebsiella pneumoniae*'da Görülen Karbapenem Direncinin Güncel Durumu**

Karbapenemler, genellikle çoklu ilaç dirençli Gram negatif bakterilerin neden oldu u hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılan beta-laktamlardır. Karbapenemlerin hem ESBL hem de AmpC laktamaz enzimlerine kar ı dirençli olması, onların son yıllardaki kullanımını önemli düzeyde arttırmı tir. Ba langıçta daha az görülmekle birlikte geçen son on yılda karbapenem dirençli bakteriler hem nonfermenter (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*) hem de fermenter (*Enterobacteriaceae*) Gram (-) basillerde daha sık görülmeye ba lamı tir. Karbapenem direncinde en önemli mekanizma olan karbapenemazlar tüm dünyada yaygın bir ekilde görülmektedir. İlk karbapenemaz üreten *Enterobacter cloacae*'da 1993'de tanımlanmasından sonra çok sayıda karbapenemaz enzimi saptanmı tir. Beta karbapenemazlar Ambler sınıflandırmasına göre A, B ve D sınıflarına dahil edilmi lerdir.

Ambler sınıf A içerisinde *Klebsiella pneumoniae*'da en sık görülen KPC enzimidir. KPC en sık *Klebsiella* 'da görülmekle birlikte son yıllarda di er *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülmektedir (107).



ekil 6.KPC üreten izolatların dünyada co rafik da ılımı (108)

KPC enzimi ilk defa izole edildi i ABD’de, Latin Amerika da Kolombiya ve Arjantin’de endemik olarak görülmektedir. Porto Riko ve Meksika da da vakalar bildirilmi tir (109). Avrupa’da hemen her ülkede görülmekle birlikte talya ve Yunanistan’da endemik olarak izlenmektedir (110). Polonya’da özellikle hastane kaynaklı *Klebsiella pneumoniae*’ya ba lı salgınlar bildirilmi tir (111). srail’de endemik olarak görülmektedir ve birçok çalı mada görülen vakaların ço unun hastane kaynaklı olmasına ra men azımsanmayacak derecede toplumsal kaynaklı vakalar da bildirilmi tir (110). Güneydo u Asya’da yeterli veri olmamakla birlikte Çin’in bazı bölgelerinde endemik olarak görülmektedir (110). Hindistan’da daha sık olarak NDM ve OXA-48 görülmekle birlikte son yıllarda KPC üreten su larda bildirilmektedir (112).

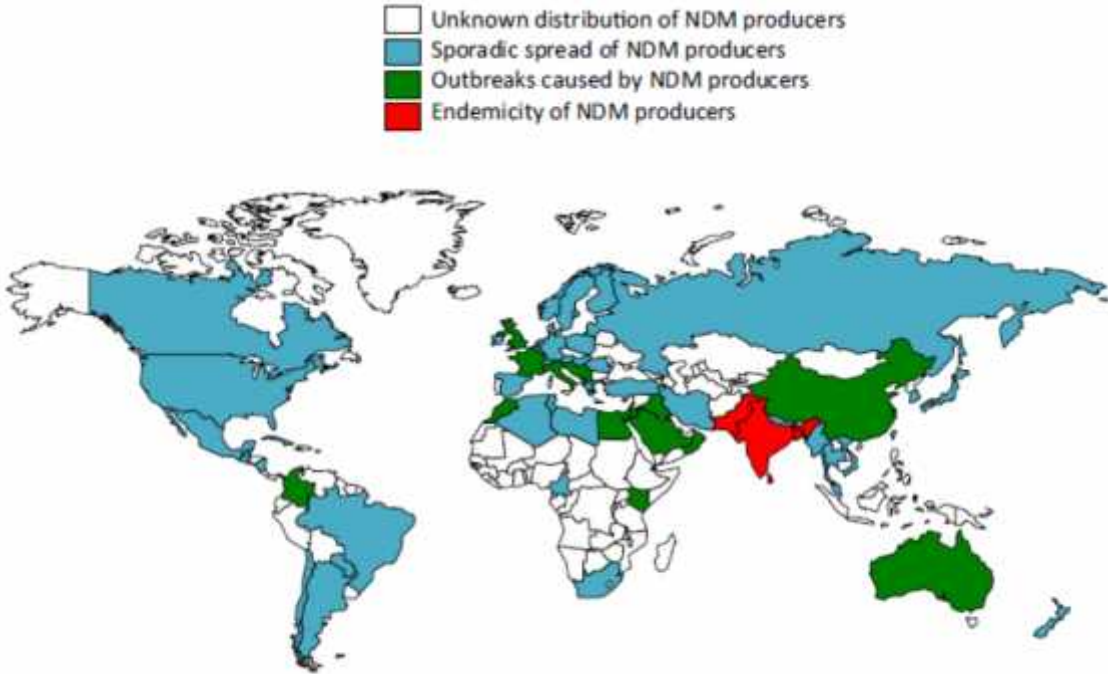
Ülkemizde 2012’de Romanya’dan transfer edilen bir hastada (113) ve 2013’de stanbul’da yenido an ünitesinde iki hastada KPC-2 izole edilmi tir (114). Daha sonra yapılan çalı malarda tespit edilmemi tir.

Ambler sınıf B metallo laktamazlar,1990’ların ba ndan itibaren bilinmektedir. Bu sınıf içerisinde VIM ve IMP dünyada yaygın görülmekle birlikte son yıllarda NDM de yo un artı tespit edilmektedir.

IMP tip laktamazlar tüm dünyada yaygın görülmele birlikte di er karbapenemazlardan daha az görülmektedir. Özellikle Japonya, Tayvan ve Do u Çin'de daha sık görülmektedir (115).

Ülkemizde ilk IMP-1 metallo beta laktamaz üreten *K.pneumoniae* su u 2003'de izole edilmi tir (116).

VIM türü enzimler ço unlukla *P.aeruginosa*'da görülmekle birlikte *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde de izole edilmektedir. Dünyada yaygın görülmekle birlikte, talya, spanya, Yunanistan gibi Güney Avrupa ülkelerinde ve Güneydo u Asya ülkelerinde; Güney Kore ve Tayvan'da endemik olarak görülmektedir. Bununla birlikte Afrika'da; Fildi i Sahilleri (117), Güney Afrika (118), Tunus (119) ve bazı Avrupa ülkelerinde; Almanya (120), Hollanda (121), Fransa'da (122,123) salgınlara neden olmaktadır. Bu salgınlarda ço unlukla VIM üreten *P.aeruginosa* ile olmakla birlikte nadiren *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden de kaynaklanmaktadır. Yunanistan'da salgınlardan sıklıkla *Enterobacteriaceae* üyeleri sorumlu olmaktadır.



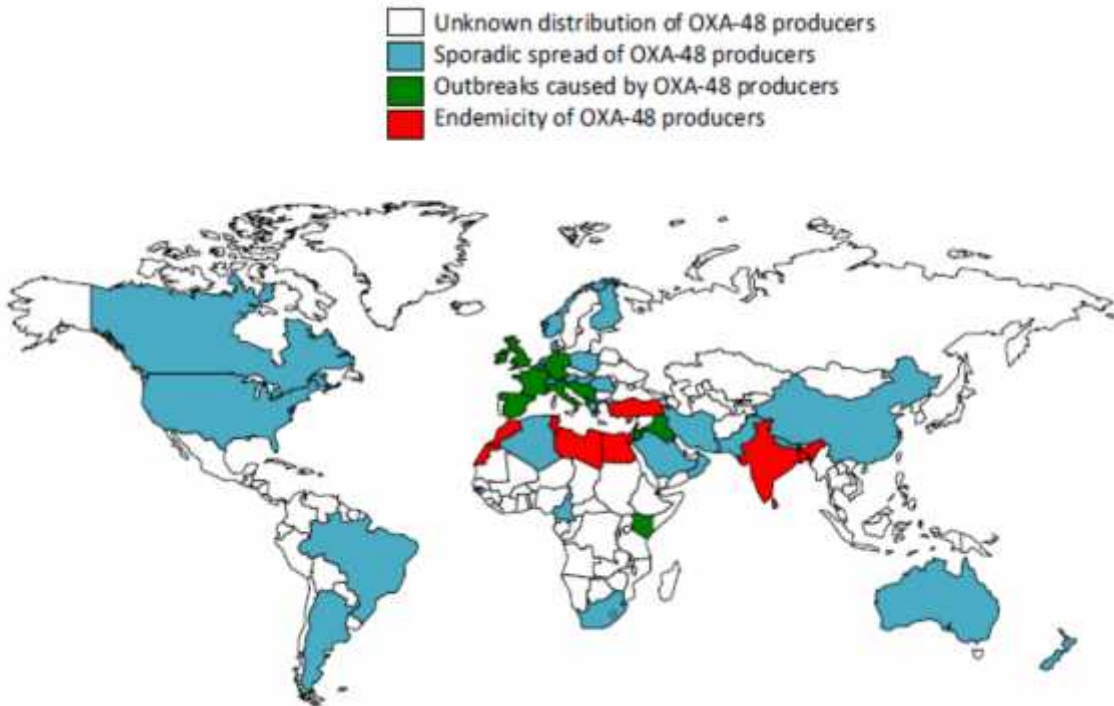
ekil 7.NDM üreten izolatların dünyada co rafik da ılımı (108)



Klinik olarak önemli bir di er metallo laktamaz olan NDM ilk izole edildi i 2009'dan günümüze dek tüm dünyada hızla yayılmaktadır. Ba langıçta Hindistan yarımadasında; Hindistan, Pakistan, Srilanka'da bulunmakla birlikte günümüzde dünyanın her bölgesinden rapor edilmektedir. Avrupa ülkelerinden ngiltere ve Fransa'da daha sık görülmektedir (124). Primer rezervuar olarak Hint yarımadası kabul edilmekle birlikte sekonder rezervuar olarak da Balkan ülkeleri (125,126), Arap yarımadası (127,128) ve Kuzey Afrika ülkeleri kabul edilmektedir.

Ülkemizde NDM-1 ilk olarak 2011'de Irak'tan gelen bir hastadan izole edilmi (129) olup ülkemizde gittikçe artan oranlarda bildirilmektedir.

Ambler sınıf D karbapenemazlardan, *Enterobacteriaceae* ailesinde en sık görülen OXA-48 karbapenemazlardır. Türkiye'de 2001 yılında ilk defa izole edilmesinden günümüze dek çok sayıda nozokomiyal salgına sebep olmu tur (130).



ekil 8.OXA-48 üreten izolatların dünyada co rafik da ılımı (108)

Ortado u ve Kuzey Afrika OXA-48 üretimi için rezervuar kabul edilmektedir. Ortado u'da; Lübnan, Umman, Suudi Arabistan, Kuveyt (131,132) ve Kuzey Afrika ülkelerinden; Fas, Cezayir, Mısır, Libya, Tunus 'da (133,134) OXA-48 sıklıkla rapor edilmektedir. OXA-48

üreten *Enterobacteriaceae*'ya ba lı hastane salgınları Avrupa ülkelerinde; Fransa, Almanya, sviçre, spanya, ngiltere, Hollanda'da rapor edilmektedir (135,136). Son raporlarda ABD'de OXA-48 üreten *K.pneumoniae* su ları bildirilmi tir (137).



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalı ma, çe itli klinik örneklerden izole edilen ve ertapenem dirençli olarak bulunan *Klebsiella pneumoniae* su larında karbapenem direncinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması ve su lar arasındaki klonal ili kilinin saptanması amacıyla yapılmı tır. Kesitsel bir ara tırma olarak planlanan bu çalı maya Ocak 2012-Haziran 2014 tarihleri arasında nönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Turgut Özal Tıp Merkezi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda çalı ılan klinik örneklerde saptanan dirençli izolatlar dahil edilmi tir. Aynı hastada tekrar eden izolasyonlardan sadece biri çalı maya alınmı tır.

Prospektif olarak toplanan su lar, tanımlama ve duyarlılık testleri sonrasında moleküler mikrobiyolojik yöntemler gerçekleştirilinceye kadar sütlü besiyerinde (Oxoid, ngiltere) -70°C'de stoklanmı tır.

#### 3.1.Kültür ve Tanımlama

Hastanemizin farklı kliniklerinden gönderilen kan, beyin omirilik sıvısı (BOS), idrar, balgam, yara yeri sürüntüsü gibi klinik örnekler kanlı agar, Eozin Metilen Blue agar (EMB) ve çukulatamsı agar (Oxoid, ngiltere) besiyerlerine ekilerek 35 °C'de 18-24 saatlik aerobik inkübasyona alındı. Üreyen bakteriler; koloni yapısı, gram boyalı mikroskopi, katalaz ve oksidaz testleri ve di er bakteriyel biyokimyasal testler gibi klasik bakteriyolojik yöntemler kullanılarak tanımlandı.

*Klebsiella pneumoniae*'nin kültür ve tanımlanmasında kullanılan besiyerleri ve di er biyokimyasal testler a a ıda belirtilmi tir.

#### Kanlı Agar Besiyeri (Oxoid/ ngiltere)

Triptikaz	15 gr
Soyton (soya enzimatik hidrolizatı)	5 gr
NaCl	5 gr
Agar	15 gr
Saf Su	1000 gr

Hazırlanı 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddeler ısıtılarak eritildikten sonra 121°C'de 15 dakika otoklavda bekletilerek steril hale getirildi. Elli °C'ye kadar so utulduktan sonra defibrine koyun kanından 70 ml eklendi ve homojenize olması için karı tırıldıktan sonra steril petri kaplarına dökülerek so utuldu.

### **Eozin Metilen Blue (EMB) Agar Besiyeri (Oxoid/ ngiltere)**

Pepton	10 gr
Laktoz	5 gr
Sükroz	5 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2 gr
Agar	13,5 gr
Eozin Y	0,4 gr (%2'lik eriyikten 2 ml)
Metilen Mavisı	0,065 gr (3,25'lik eriyikten 0,2 ml)
Saf Su	1000 ml'ye tamamlandı

Hazırlanı 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddeler kaynatılarak eritildi ve 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril hale getirildi. Steril petri kaplarına dökülerek so uyup katıla maları beklendi.

### **Çukulatamsı Agar Besiyeri (Oxoid/ ngiltere)**

Proteoz Pepton	7,5 gr
Poli Pepton	7,5 gr
Ni asta	1 gr
NaCl	5 gr
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 gr
Agar	10 gr
Saf Su	1000 ml

Hazırlanı 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddeler sıcak suda kaynatılarak eritildikten sonra otoklavda 121°C de 15 dakika bekletilerek steril hale getirildi. Karı ımın ısısı 65 °C olunca, içine 70-100 ml steril kan eklendi. Besiyeri iyice karı tırılarak eklenen kanın tam olarak hemoliz olması sa landı ve steril petri kutularına döküldü.

Yukarıda sayılan ve içerdi i maddeler belirtilen besiyerlerine usülüne uygun olarak ekimi yapılmı olan klinik örnekler 35 °C'de 18-24 saat inkübe edildikten sonra de erlendirmeye alındı. Koloni yapısı, üreme özellikleri ve Gram boyama özelliklerine göre Gram negatif çomak morfolojisindeki bakteriler alt tür düzeyinde tanımlanmaları için uygun biyokimyasal test ortamlarına ekildi. Bu ortamlarda 35°C'de 18-24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda

gözlenen reaksiyonlara göre bakterilerin tanımlanması yapıldı. Bakterilerin identifikasyonunda kullanılan gereçler;

### **Triple Sugar Iron Agar (TSI) (Oxoid/ ngiltere)**

Yeast extract	3 gr
NaCl	5 gr
Laktoz	10 gr
Sükroz	10 gr
Glikoz	1 gr
Ferrous amonium sülfat	0,2 gr
Na-thiosulfat	0,025 gr
Agar	3 gr

Hazırlanı 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddeler belirtildi i orandaki karı ımından 47 gr tartılarak 1 litre distile suda eritildi ve PH:7.4'e ayarlandı. Otoklavda 121°C'de steril edildikten sonra steril cam tüplere yatık olarak döküldü.

Yorumlama: Hafif alkali ortamlı olarak hazırlanan TS besiyeri, içerdi i fenol kırmızısı sayesinde alkali ortamda kırmızı-pembe görünümde dir. noküle edilen bakteri, TS ortamında bulunan karbonhidratları hidrolize etti i takdirde ortamın pH'sı aside kaymakta ve fenol kırmızısı rengini kaybetmekte ve besiyeri sarı bir renk almaktadır. Bu durumun gözlenmesi "pozitif sonuç" olarak kabul edilir. E er inoküle edilen bakteri karbonhidratlardan hiçbirini kullanmazsa ortamın PH'sı alkali kalmakta yani besiyerinin rengi pembe olarak devam etmektedir. Bu ise "negatif sonuç" olarak yorumlanmaktadır.

### **Simmon's Sitrat Agar (Oxoid/ ngiltere)**

Na-sitrat	2 gr
NaCl	5 gr
MgSO4	0,2 gr
Amonyum dihidrojen fosfat	1 gr
Dipotasyum fosfat	1 gr
Bromtimol mavisi	0,08 gr
Agar	15 gr

Hazırlanı 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddelerin belirtildi i orandaki karı ımından 24,2 gr tartılarak 1 litre distile suda eritildi ve ortam pH:6.9'a ayarlandı. Otoklavda 121°C de steril edildikten sonra tüplere yatık olarak döküldü.

Yorumlama: Normal durumda koyu ye il renkli olan sitrat besiyeri; test edilen bakteri su u sitratı karbon kayna ı olarak kullanıyorsa, Prusya Mavisi rengine döner. Bu durum “pozitif reaksiyon” olarak yorumlanır. Besiyerinde herhangi bir renk de i imi olmaması “negatif sonuç” olarak kabul edilir.

#### **Üre Agar (Christensen Urea Agar) (Oxoid/ ngiltere)**

Pepton	1 gr
Glikoz	1 gr
NaCl	5 gr
Disodyum fosfat	1,2 gr
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,8 gr
Fenol kırmızısı	0,012 gr
Agar	15 gr

Hazırlanma 1: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddelerin karı ımdan 18 gr alınarak 100 ml distile suda eritildi. pH: 6.8’e ayarlandı. Otoklavda 121°C’de steril edildikten sonra %29’luk üre solüsyonundan eklendi. Elli °C’ye kadar so uduktan sonra 900 ml distile su+agar karı ımı ile birle tirilerek tüplere dik olarak döküldü.

Yorumlama: Hafif asit ortamlı olarak hazırlanan besiyerinin bu ko uldaki do al görünümü sarı renktedir. Bakteri inokulasyonundan sonra; test edilen bakteri su u üreaz enzimine sahipse besiyerinde bulunan üreyi parçalayacak ve son ürün olarak amonya ın ortaya çıkı ını sa layacaktır. Bu ise ortamın pH’ını alkaliye kaydıracak ve besiyerinde bulunan, ancak asidik ortamdan dolayı sarı renkli olan, fenol kırmızısının pembe renge dönmesine neden olacaktır. Besiyerindeki pembe-kırmızı renk de i imi “pozitif sonuç” olarak kabul edilirken, besiyeri renginin sarı olarak devam etmesi “negatif sonuç” olarak yorumlanır.

#### **ndol Besiyeri (SIM Medium; Oxoid/ ngiltere)**

Tripton	2 gr
Pepton	6,1 gr
Ferrous amonium sülfat	0,2 gr
Na-thiosulfat	0,2 gr
Agar	30,5 gr

Hazırlanma 1. Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddeler belirtilen oranlardaki karı ımından 39 gr tartılarak 1000 ml distile steril su içerisinde eritildi. pH:7.3’e ayarlandı. Otoklavda 121°C’de steril edildikten sonra tüplere dik olarak döküldü.

Yorumlama: Bakteri inoküle edilmiş olan 'SIM' besiyerleri 35°C'de 16-20 saat inkübe edildikten sonra besiyeri üstüne kovaks ayırıcı damlatıldı. Normal durumda sarı renkli olan kovaks ayırıcı kırmızı pembe bir renk değişimine uğarsa pozitif reaksiyon, böyle bir renk değişimi gözlenmese negatif reaksiyon olarak değerlendirilir.

### **Kovaks ayırıcı**

zoamil alkol	150 ml
p-dimetilaminobenzaldehit	10 gr
HCL konsantre	50 ml

### **3.2.Antimikrobiyal duyarlılık testleri**

Soyutlanan bakterilerin biyokimyasal özelliklerine göre alt tür düzeyinde identifikasyonları yapıldı. *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanan kökenler antimikrobiyal duyarlılık testine alındı.

Tanımlanan *K. pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile araştırıldı (138). Bu amaçla kullanılan gereçler;

### **Mueller-Hington Agar (Oxoid/ ngiltere)**

Et suyu	300 ml
Pepton	17.5 gr
Ni astar	1.5 gr
Agar	17 gr

Hazırlanışı: Hazır dehidrate toz olarak temin edilen yukarıdaki maddelerden oluşan karışımdan belirtilen miktarda alınarak steril distile su içinde ısıtılarak eritildi. Ortam pH'sı 7.4'e ayarlandı. Otoklavda 121 °C'de steril edildikten sonra steril petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü.

Kültür plaklarında üremiş olan *Klebsiella pneumoniae* kolonilerinden steril pamuk uçlu bir eküvyon yardımıyla 1-2 koloni alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 Mc Farland bulanıklık sağlanacak şekilde süspansiyon edildi. Bu süspansiyon yine steril pamuklu eküvyon yardımıyla Mueller-Hinton agar üzerine yayıldı. Plakların kuruması beklendikten sonra üzerlerine antibiyotik emdirilmiş kağıt disklerden (Oxoid/ ngiltere) yerleştirildi. Otuz beş °C'de 24 saatlik inkübasyonu takiben antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon

zonlarının çapları ölçüldü. Elde edilen sonuçlar CLSI kriterlerine göre yorumlanarak ertapeneme dirençli bulunan su lar yine CLSI önerileri do rultusunda Modifiye Hodge testine alındı.

Klebsiella su ları için ertapenem ve imipenem duyarlılık sınırları Tablo 4’de gösterilmi tir.

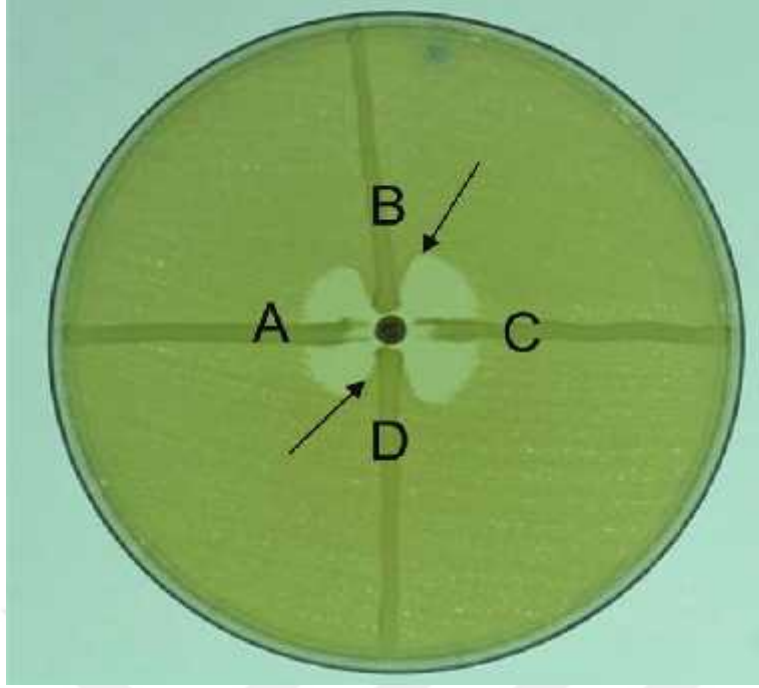
**Tablo 4.** *K. pneumoniae*’nın karbapenem duyarlılık sınır de erleri (138).

Mikroorganizma		M K sınır de eri (µg/ml)		Zon çapı sınır de eri (mm)	
		S	R	S	R
<i>K.pneumoniae</i>	Ertapenem	0,5	2	22	18
	mipenem	1	4	23	19

### 3.2.1.Modifiye Hodge Testi

*Escherichia coli* ATCC 25922 su undan 0,5 McFarland bulanıklı nda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bakteri süspansiyonu steril serum fizyolojik ile 1:10 oranında sulandırıldı ve pamuklu eküvyon ile MHA pla ına yo un ekim yapıldı. Besiyerinin 3-5 dakika kuruması beklendikten sonra petri pla ının ortasına ertapenem (10 µg) veya meropenem (10 µg) diskleri yerle tirildi. Daha sonra test edilecek bakteriden 3-4 koloni pamuk uçlu eküvyon çubukla alınarak karbapenem diskinin kenarından ba layarak pla ın kenarına do ru düz bir hat olu turacak ekilde ekim yapıldı. Karbapenem diskinin etrafında olu an inhibisyon zonunun, test edilen izolatın ekim çizgisine do ru girinti yapması (yonca yapra ı eklinin olu ması) pozitif sonuç olarak de erlendirildi. Girintinin olmaması negatif sonuç olarak yorumlandı (138). Modifiye Hodge testine ait görüntü ekil 9’da sunulmu tur.





**ekil 9.** Modifiye Hodge testi (B ve D pozitif izolat; A ve C negatif izolat. (139)

### 3.2.2. Etest le mipenem Minimal nhibitör Konsantrasyon (M K) Tesbiti

Çalı maya alınan ertapenem dirençli *K. pneumoniae* su larının imipnem M K düzeyleri Etest yöntemi ile ara tırıldı.

Test edilecek bakteri su una ait kolonilerden steril pamuk uçlu eküvyon ile bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içinde McFarland 0.5 de erine göre bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyondan yine pamuk uçlu eküvyon yardımıyla alınarak Mueller Hinton agar yüzeyine yo un ekim yapıldı. Plaklar 5-10 dk etüvde bekletilerek kurumaları sa landı. Ardından imipenem Etest (BioMérieux, France) stripi inoküle edilmi plak üzerine konuldu ve 24 saat 35°C'de inkübasyona alındı. Bu süre sonunda olu an inhibisyon elipsinin Etest stripini kesti i nokta o su un imipenem M K düzeyi olarak kabul edildi.

### 3.3.Genotipik Yöntemlerle Karbapenemaz Genlerinin Saptanması

Ertapenem dirençli *K. pneumoniae* su larının karbapenem direncine neden olan genlerin ara tırması Polimerize Zincir Reaksiyonu (PZR, PCR) ile yapıldı. Yöntemin basamakları;

#### 3.3.1.DNA zolasyonu(Ekstraksiyon)

Su lar kanlı agar besiyerine genotip tayini için pasajlandı. Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak 1ml steril distile su içerisinde 4 McFarland

bulanıklı ında süspanse edildi. Her bir örnek en az 5 dakika vortekslenerek homojen hale getirildi. Daha sonra QiaSymphony (Qiagen, Almanya) total nükleik asit izolasyon kiti ile DNA ekstraksiyonu yapıldı ve elde edilen DNA örnekleri -20°C’de PZR i lemine kadar saklandı.

### 3.3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Çalı ılan kökenlerde *KPC*, *NDM*, *OXA-48*, *IMP*, *VIM* grup genlerinin varlı ını ara tırmak amacıyla PZR yapıldı. PZR için kullanılan solüsyonlar ve amplifikasyon ko ulları a da belirtilmi tir:

#### **TopTaq (Qiagen) PZR reaksiyon karı ımının hazırlanması:**

2X TopTaq Master Mix karı ımı	12.5µl
10X CoralLoad Concentrate	2.5 µl
Primer-F	1 µl
Primer-R	1 µl
DNAaz RNAaz free saf su	7 µl
DNA	1 µl
<b>Toplam hacim</b>	<b>25 µl</b>

Çalı maya alınan su larda daha önce tanımlanmı olan karbnapenemaz genleri olan *KPC*, *NDM*, *OXA-48*, *IMP*, *VIM* ara tırıldı. Bu genler için kullanılan oligonükleotid primerleri Tablo 5’te gösterilmi tir.

**Tablo5.** PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler

Hedeflenen gen bölgesi	Hedef primer adı	Primer dizilimi (5’-3’)	referans
<i>blaKPC</i> grup/ 785 bç	KPC-F KPC-R	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATC	(140)
<i>blaOXA-48</i> grup/177 bç	OXA-48-F OXA-48-R	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	(140)
<i>blaNDM-1</i> grup/ 82 bç	NDM-F NDM-R	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	(141)
<i>blaVIM</i> /390 bç	VIM-F VIM-R	GATGGTGTTTGGTCGCATA CGAATGCCGAGCACCAG	(141)
<i>blaIMP</i> /188 bç	IMP-F IMP-R	GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC CCAAACYACTASGTTATCT	(141)

### **Amplifikasyon ko ullanları**

Amplifikasyon için GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems/ USA) cihazı kullanıldı. Amplifikasyon tüpleri cihaza yerleştirilerek 94°C'de 3 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, primer bağlanması için 62°C'de 30 saniye ve 72°C'de 1 dakika uzama ile toplam 35 siklus ve final uzama olarak 72°C'de 10 dakika olacak şekilde uygulandı.

### **3.3.3. Agaroz jel elektroforezi**

PZR reaksiyonu ile çoğaltılan amplifikasyon ürünleri agaroz jelde elektroforeze tabi tutularak ayrı tırıldı.

Agaroz Jel Elektroforez için Hazırlanan Karışımlar

10xTBE buffer

Stok solüsyonu 10xTBE'den distile su ile 1/10 oranında sulandırılarak elde edildi.

Gel loading dye

Bromphenol	40 mg
Gliserol	5 ml
0.5 M EDTA	1.5 ml
Distile su	4.5 ml olacak şekilde karıştırılır

**%1.5 Agaroz jel:** 2.25 gr agaroz (AppliChem, ABD) 150 ml 1xTBE tamponu içinde karıştırılarak mikrodalga fırında eritildi. Üzerine 5mg/ml'lik etidyum bromürden 0.5 ng/ml olacak şekilde eklenerek 10 dakika soğumaya bırakıldı. Kalıbın içindeki jelin katılaşması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dk bekletildi. Katılaşan jel kalıbı taraclarla çıkartıldıktan sonra kuyucuklar negatif kutupta olacak şekilde elektroforez tankının içine yerleştirildi. Tankın içi jelin üzeri tamamen kapanıncaya kadar 1X TBE ile dolduruldu. Çoğaltılmış DNA örneklerinin her birinden 10 µL kuyucuklara yüklendi. Ürünler 100 volt akım altında 2 saat boyunca elektroforeze tabi tutuldu. Oluşan bantlar UV ışığı altında DNA moleküler ağırlık standardı (DNA Molecular Weight Marker X (0.1-10.0 kb; Roche, Almanya) ile karşılaştırılarak yorumlandı ve foto rafları Gel Logic 2200 imaging system (Kodak Company, ABD) ile çekildi.

Sular arasındaki klonal bakterilerin tespiti için Durmaz ve arkadaşlarının uyguladıkları, “Pulsed Field Gel Electrophoresis” (PFGE) yöntemi modifiye edilerek kullanıldı (142). Yöntemin basamakları:

#### **3.4.1. zotların hazırlanması**

Biyokimyasal ve/veya moleküler yöntemlerle tür düzeyinde tanımlaması yapılmı bakterilerden KA besiyerine tek koloni ekimi yapıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler plastik öze ile toplanarak 1 ml hücre süspansiyon tamponu (HST) (100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) içinde süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonu, 2500 x g’de, 4°C’de, 15 dakika (alternatif olarak 13 000 x g 4°C’de 2 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek, kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (UV/Vis. Spectrophotometer, Boeco, Germany) yardımıyla 590 nm’de 1 absorbans olacak şekilde ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroz gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

#### **3.4.2. zotların Agaroz Gömülmesi**

HST içerisinde %2’lik düşük erime ısıları agaroz (Gibco BRL, Paisley, UK) hazırlandı. 0.2 g agaroz, 100 ml’lik balona konuldu. Üzerine 9 ml HST eklendi, yavaşça karıştırılarak agarın dağılması sağlandı. Balonun ağzına alüminyum folyo kapatılarak mikrodalga fırında 10 saniye tutulup, çıkarılarak hafifçe karıştırıldı. Tekrar 2–3 saniye mikrodalga fırında tutuldu. Agaroz iyice çözülünceye kadar kısa süreli mikrodalgada tutma işlemi tekrarlandı. Agaroz karışımından 500 µl’lik ependorf tüplere dağıtıldı ve işlem süresince 45-50°C’lik kuru ısı bloğunda bekletildi. HST içinde hazırlanan bakteri süspansiyonundan 500 µl alınarak 50°C ısı bloğunda bekletilen düşük erime ısıları agaroz 1/1 oranında eklendi. Pipetaj yapılarak iyice karıştırılması sağlandı. Agaroz karışımı hava kabarcıkları olmayacak şekilde agaroz kalıbına (1mm by 5mm by 1.5mm, Bio Rad Laboratories) 100 µl olacak şekilde dağıtıldı. Kalıplar, agaroz katılacağı kadar +4°C’de, yaklaşık 10 dakika bekletilerek agarozun homojen olarak katılması sağlandı.

#### **3.4.3. Agaroz içindeki hücrelerin parçalanması**

5 ml’lik steril kapaklı tüplere, 0.5 ml hücre parçalama tamponu-1(HPT-1) (50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5 mg/ml proteinaz K) konuldu. İçerisinde bakteri bulunan agaroz, kalıptan çıkarılarak HPT-1 solüsyonuna yerleştirildi. 37°C’de 1 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi. HPT-1 dökülerek, yerine 0.5 ml HPT-2 (0.5 M EDTA, 1 mg/ml proteinaz K) konuldu. 55°C’de 2 saat çalkalamalı su banyosunda bekletildi.

#### 3.4.4.Hücre lizisinden sonra agaroz kalıpların yıkanması

Agaroz kalıplar içerisinde gömülen hücrelerin parçalama i leminin ardından HPT-2 aspire edildi. içinde agaroz kalıp bulunan tüpe, 50°C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan (Reagent Grade Type 1) 4 ml eklenerek, 50 °C çalkalamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen aspire edilip, su ile yıkama i lemi iki defa daha tekrarlandı. Su tamamen aspire edildi. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50°C'de 15 dakika olmak üzere), 4 ml TE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,6) tamponuyla yıkandı. Böylece içerisinde hücre kalıntılardan arındırılmış DNA bulunan agaroz, restriksiyon enzimi (RE) ile kesime hazır hale getirilmi oldu.

#### 3.4.5.Agaroz kalıpları içindeki DNA'nın RE ile kesilmesi

DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bistüri yardımı ile 1/3 oranında kesildi. *Xba-I* enzimi kullanıldı.

*Klebsiella pneumoniae* DNA'sını içeren kalıpların *Xba-I* RE ile kesimi:

1. DNA içeren agaroz kalıbı bir lam üzerine alınarak bir bistüri yardımıyla ¼ oranında kesildi. Parçalardan biri, 100 µl 1x *XbaI* tamponu içine konularak çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 10 dakika bekletildi. (Di er parçalar sonraki çalı malarda kullanılmak üzere TE tamponu içinde saklandı). Sonra sıvı aspire edildi.

2. Her agaroz kalıbı için aşağıdaki karışım hazırlandı.

10x <i>XbaI</i> tamponu	10 µl
<i>XbaI</i> enzimi (12 U / µl (Promega Co, USA))	3 µl
BSA (10 mg/ml)	1 µl
<u>steril ultra saf su (Reagent Grade Type 1)</u>	<u>86 µl</u>
Toplam hacim	100 µl

3. Bu karışımın içerisinde, enzimin tamponu ile yıkanmış agaroz kalıbı konulup, çalkalamalı su banyosunda 37°C'de 2 saat inkübe edildi.

4. inkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi ve elektroforeze uygun hale getirilmi oldu.

#### 3.4.6. Elektroforez jelinin hazırlanması ve kalıpların jele yüklenmesi

0.5x TBE (44,5 mM Trisma base, 44,5 mM Borik asit, 1 mM EDTA, pH 8,0) içinde 100 ml olacak şekilde %1' lik agaroz (pulsed-field certified agarose, Bio-Rad Laboratories) hazırlandı. 1 gr "pulsed-field certified agarose" 200 ml'lik balona konup. üzerine 100 ml 0,5x TBE eklendi ve mikrodalga fırında agar homojen bir şekilde eritildi. Agaroz iyice çözüldükten sonra, balon 45–50 °C'lik su banyosuna konuldu. Agaroz dökülecek kaset

hazırlandı ve RE ile kesilmi olan agaroz kalıplarının her biri, 15 di li tara ın di lerinin uç kısmına (tara ın uç çizgisine tam paralel olacak ekilde) yerle tirildi. Tara ın iki kenar ve ortasındaki di lerine kontrol su una ait kalıplar yüklendi. Kurutma kâ ıdı veya havlu ile agaroz kalıplarının etrafındaki sıvının fazlası alındı. Maksimum 5 dakika oda ısısında bekletildikten sonra, örnek konulan kısım DNA'nın yürüyece i yöne gelecek ekilde, tarak agaroz dökülecek kaset içine yerle tirildi. Su banyosundan çıkarılmı ve sıcaklı ı yakla ık 45-50 °C olan agaroz dikkatli bir ekilde hava kabarcı ı olu turulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında 20–30 dakika katıla maya bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Kaset çerçeveleri çıkarılarak 1900-2000 ml 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerle tirildi.

### 3.4.7. Elektroforez

*Klebsiella pneumoniae* için CHEF-DR II sisteminde (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) uygulanan elektroforez ko ulları:

Ba langıç vuru süresi 5 sn, biti vuru süresi 30 sn, vuru açısı 120°, akım 6 V/cm<sup>2</sup>, sıcaklık 14°C, süre 24 saat (TBE tamponu pH=8.5).

### 3.4.8. Sonucun gözlenmesi ve analizi:

a. Elektroforez sonrasında jel, 5µg/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf suda 20 dakika bekletildi. UV ı ık altında görüntülendi.

b. Gel logic 2200 imaging system (Kodak Company, NY, USA) kullanılarak DNA bant görüntülerinin foto rafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi.

c. Gel Compar II yazılım sistemi (version 3.0; Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium) kullanılarak bant profilleri analiz edildi.

Bant analizleri için benzerlik hesaplarının yapılmasında Pearson korelasyon katsayısı ve kümeleme analizi için de UPGMA ("Unweighthed Pairwise Grouping Matematical Avenaging" matematiksel ortalamayla a ırlıksız çiftlerin gruplandırılması) yöntemi kullanıldı.

zolatlar benzerlik katsayıları göz önüne alınarak ayırt edilemez (benzerlik >%95), benzer (benzerlik >%90-95) ve farklı (benzerlik <%90) olarak sınıflandırıldı. Birbirleriyle %95'in üzerinde benzerlik gösteren su lar ana klon, ana klonlar içerisinde de %90'nin üzerinde benzer klonlar alt tip olarak kabul edildi. Benzerlik oranları %90'in altında olan su lar ise di erlerinden farklı olarak de erlendirildi.

#### 4. BULGULAR

Yaklaşık 30 aylık çalışmaya süresince laboratuvarımızda 135132 bakteriyolojik kültür işlemi yapılmış çeşitli klinik örneklerden toplam 2074 adet *K. pneumoniae* suyu tanımlanmıştır. Yapılan duyarlılık testleri sonucunda 70 (%3.3) *K. pneumoniae*'nin karbapenem dirençli olduğu saptanmıştır. Bu suşların 22'si kan ve 21'i idrar izolatu olup ensik olarak pediatri ve organ nakli kliniklerinden izole edilmiştir.

Çalışmaya alınan *K. pneumoniae* suşlarının izole edildiği örnek tipi ve örneği gönderen kliniklere göre dağılımı Tablo 6.'da gösterilmiştir.

**Tablo 6.** *K.pneumoniae* suşlarının örnek tipi ve örneği gönderen kliniklere göre dağılımı.

Klinik	Örnek Tipi						Toplam (n,%)
	Kan	İdrar	Balgam	Yara	Dren	SVS	
GCYB	4	–	–	2	2	–	8 (11,4)
BCYB	2	1	–	–	–	2	5 (7,2)
DYB	–	–	4	1	–	–	5 (7,2)
Dahiliye	4	2	–	–	–	–	6 (8,5)
Organ Nakli	6	2	1	–	3	2	14 (20)
Pediatri	–	12	–	3	–	–	15 (21,5)
Pediatri YB	6	1	3	2	–	–	12 (17,2)
Enfeksiyon	–	1	–	1	–	–	2 (2,8)
Reanimasyon	–	1	–	–	–	–	1 (1,4)
Üroloji	–	1	–	–	–	–	1 (1,4)
Ortopedi	–	–	–	1	–	–	1 (1,4)
<b>Toplam (n)</b>	<b>22</b>	<b>21</b>	<b>8</b>	<b>10</b>	<b>5</b>	<b>4</b>	<b>70 (100)</b>

n: Örnek sayısı; SVS: Steril Vücut Sıvısı; GCYB: Genel cerrahi yoğun bakım; BCYB: Beyin cerrahi yoğun bakım; DYB: Dahiliye yoğun bakım

Yapılan Ettest M K analizinde, çalışmaya alınan 70 izolatın 23'ünün (%32,8) imipenem M K düzeyi duyarlı sınırlar içinde ( $<4 \mu\text{g/ml}$ ) bulunurken saptanan dağılım  $0.125\text{-}3 \mu\text{g/ml}$  arasında olmuştur. Geri kalan 47 suşun M K düzeyleri ise dirençli ( $\geq 4 \mu\text{g/ml}$ ) sınırlar içinde olup imipenem M K dağılımı  $4\text{-}32 \mu\text{g/ml}$  olarak saptanmıştır.

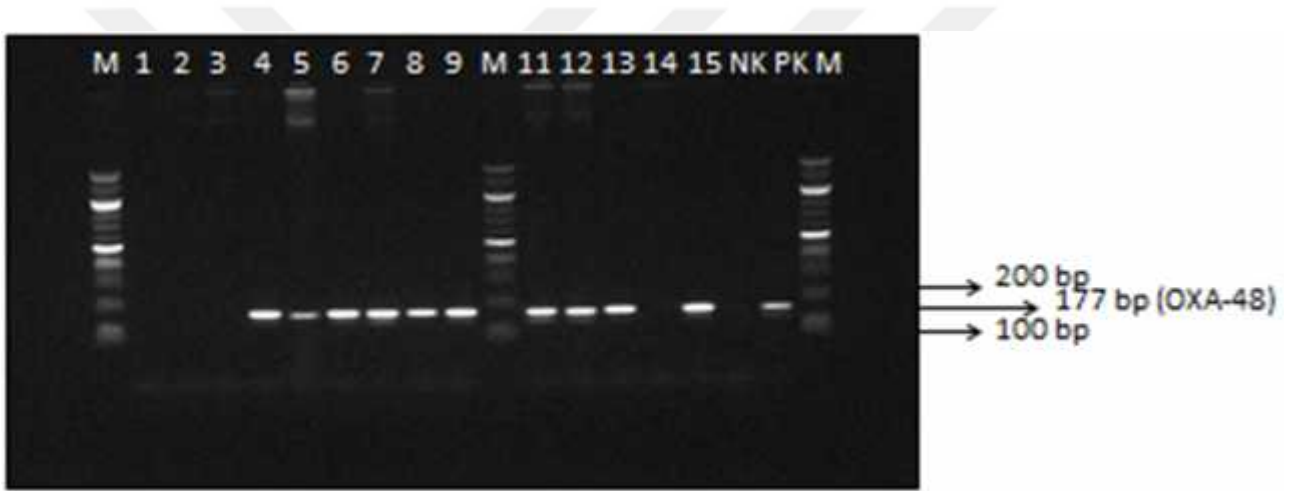
#### 4.1.Karbapenem Direnç Genleri

Çalı maya alınan toplam 70 su un 61'inde (%87.1) çalı lan direnç genlerinden en az biri saptanırken, geri kalan 9 (%12.8) su ta çalı ılan karbapenemaz direnç geni bulunamamı tır.

Çalı ılan su lardan 51'inde (%72.8) *OXA-48* geni, 11'inde (%15.7) *NDM* geni ve 3'ünde (%4.2) *VIM* geni saptanmı tır. *OXA-48* pozitif bulunan 51 su un 4'ünde *NDM* geni birlikte saptanmı tır.

*OXA-48* geni saptanan 51 su un 18'i kan, 14'ü idrar, 7'si balgam, 6'sı yara, 4'ü dren ve 2'si BOS örneklerinden izole edilmi ti.

Bu genin varlı ını gösteren PZR amplifikasyon ürünününün jel elektroforezine ait foto rafı ekil 10' da gösterilmi tir.



M: 1200 bp'lik marker; NK: Negatif Kontrol; PK: Pozitif Kontrol; 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 15: Pozitif zolatlar; 1, 2, 3, 14: Negatif izolatlar.

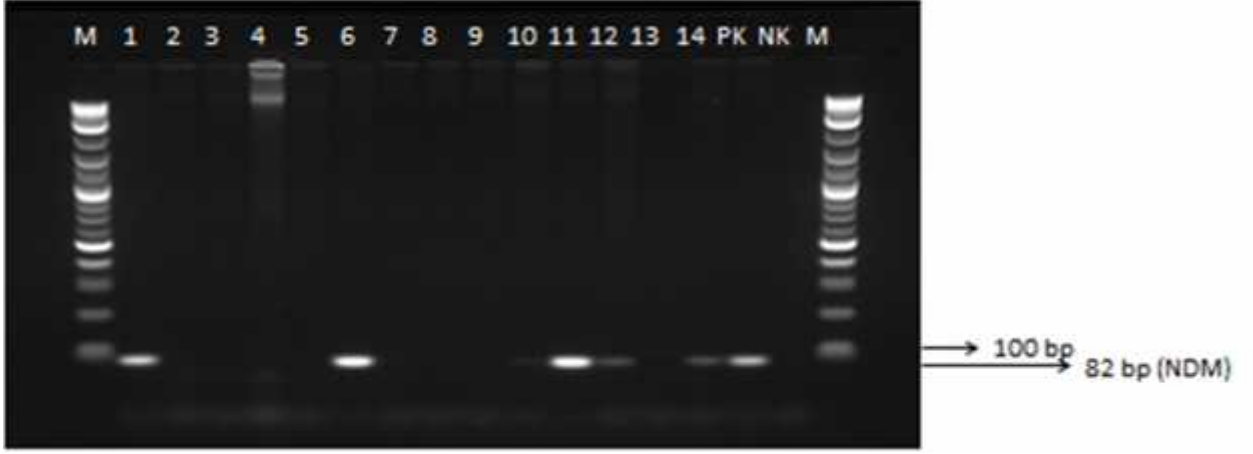
**ekil 10.** Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında 177 bp'lik *OXA-48* geninin saptandı ı agaroz jel elektroforez görüntüsü.

*OXA-48* geni bulunan su ların 34'ünün imipenem M K de eri 4 µg/ml iken geri kalan 17 su un M K de eri bu sınırın altında saptanmı tır. *OXA-48* pozitif bulunan su ların imipenem M K da ılımı 0.5 µg/ml ile 32 µg/ml arasında de i im göstermi ve bu su lar için imipenem M K<sub>50</sub> de eri: 4 µg/ml ve M K<sub>90</sub> de eri 32 µg/ml olarak hesaplanmı tır.

*NDM* geni bulunan 11 su un 7'sinde sadece *NDM* geni; 4'ünde ise *NDM* ile *OXA-48* birlikte bulunmu tur. *NDM* geni saptanan 11 su un 4'ü kan, 3'ü balgam, 2'si yara, 1'i idrar ve 1'i de dren örneklerinden izole edilmi tir.

Bu genin varlı ını gösteren PZR amplifikasyon ürünününün jel elektroforezine ait foto rafı ekil 11'de gösterilmektedir.





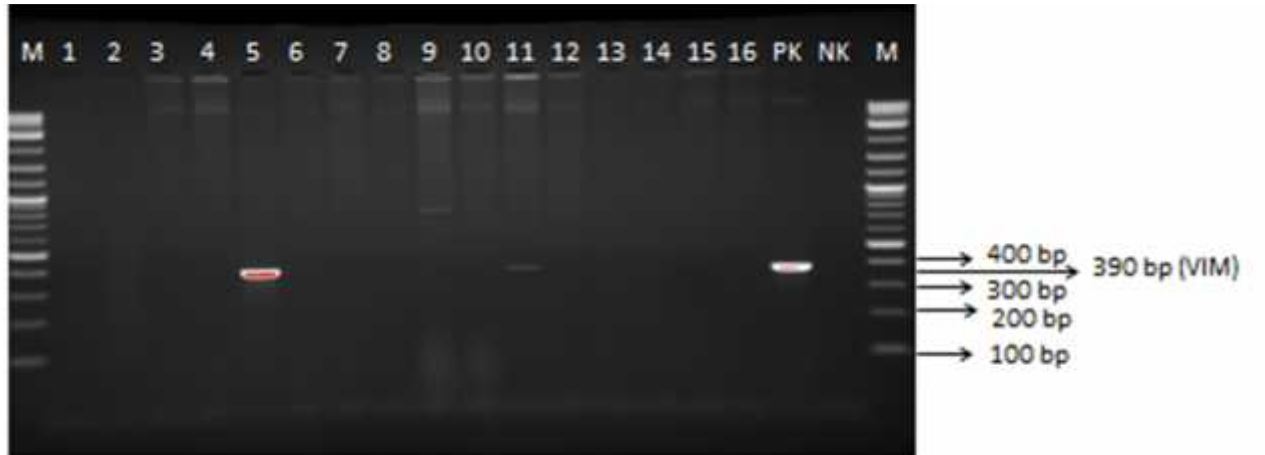
M: 1500 bp'lik marker; PK: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; 1, 6, 11, 12, 14: Pozitif zolatlar; 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 13: Negatif zolatlar.

**ekil 11.** Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında 82 bp'lik *NDM* geninin saptandığı agaroz jel elektroforez görünütüsü.

*NDM* pozitif bulunan su ların imipenem M K düzeyleri 3 µg/ml ile 32 µg/ml arasında bulunmuştur. Bu su lar için imipenem M K<sub>50</sub> de eri 16 µg/ml ve M K<sub>90</sub> de eri 32 µg/ml olarak hesaplanmıştır.

Çalınmaya alınan 70 su dan 3'ünde *VIM* geni tesbit edilmiştir. *VIM* geni saptanan 3 su nun 2'si idrar ve 1'i de dren örneklerinden izole edilmiştir.

Bu genin varlığını gösteren PZR amplifikasyon ürünününün jel elektroforezine ait fotoğrafı ekil 12'de gösterilmiştir.



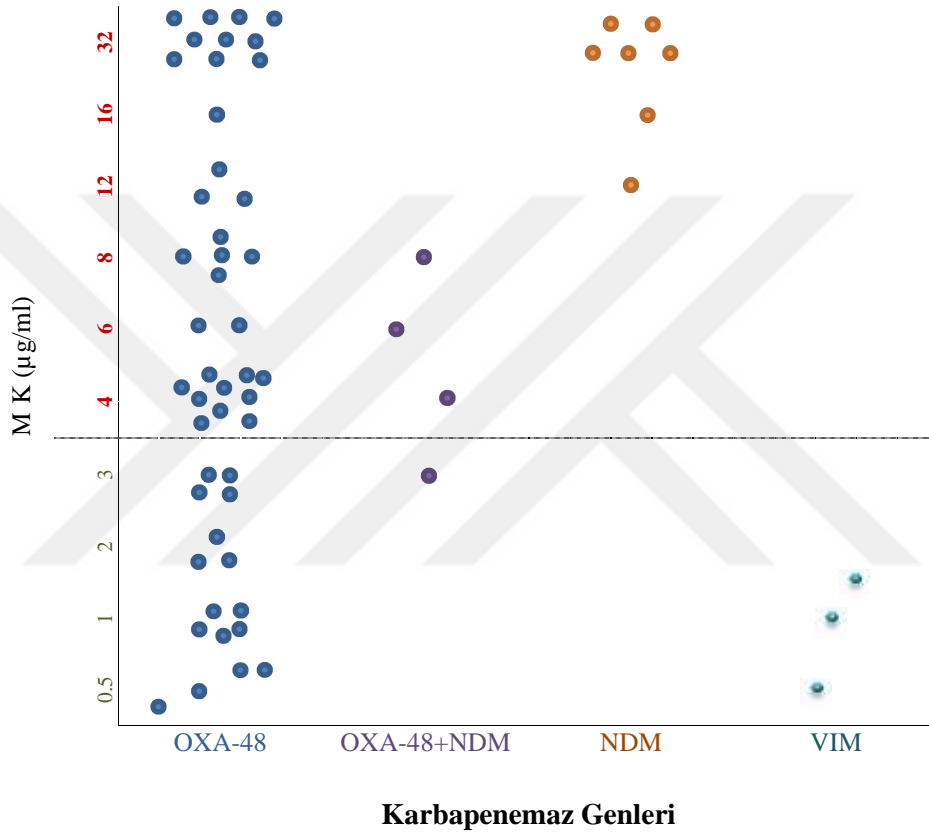
M: 1500 bp'lik marker; PK: Pozitif Kontrol; NK: Negatif Kontrol; 5: Pozitif izolat; 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16: Negatif zolatlar.

**ekil 12.** Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında 390 bp'lik *VIM* geninin saptandığı agaroz jel elektroforez görünütüsü.

VIM pozitif bulunan 3 su un imipenem M K düzeyleri; 0,5 µg/ml, 1 µg/ml ve 1,5 µg/ml olarak saptanmıştır.

Bu çalışmaya kapsamına alınan 70 *K. pneumoniae* suunun hiçbirinde IMP ve KPC genleri saptanmamıştır.

Çalışılan su ların saptanan karbapenemaz genlerine göre elde edilen M K değerlerinin dağılımı Şekil 13'de gösterilmiştir.



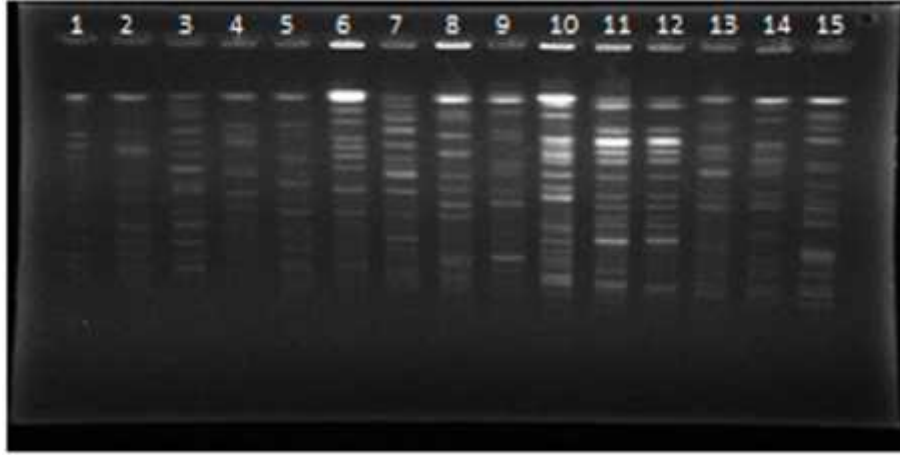
**Şekil 13.** Çalışılan su ların taşıdıkları genlere göre ölçülen imipenem M K değerlerinin dağılımı

#### 4.2. Su ların Klonal ilişkisi: PFGE Sonuçları

Çalışmaya alınan 70 *K. pneumoniae* suundan 67'si 59 farklı PFGE profili göstermiş ve geri kalan 3 su ise anlamlı bir bant profili oluşturmamıştır. Klonal yönden ilişkili su lar, 4 farklı küme içerisinde yer almış ve su ların kümeleme oranı %18 olarak saptanmıştır.

Toplam 67 *K. pneumoniae* suunun 12'si herhangi bir küme içerisinde yer almıştır. En büyük küme beş üyeli genotip 58'dir. Bunu sırayla üç üyeli genotip 34, iki üyeli genotip 29 ve iki üyeli genotip 57 takip etmiştir.

*K.pneumoniae* su larına ait PFGE görüntüsü ekil 14 'de gösterilmektedir.



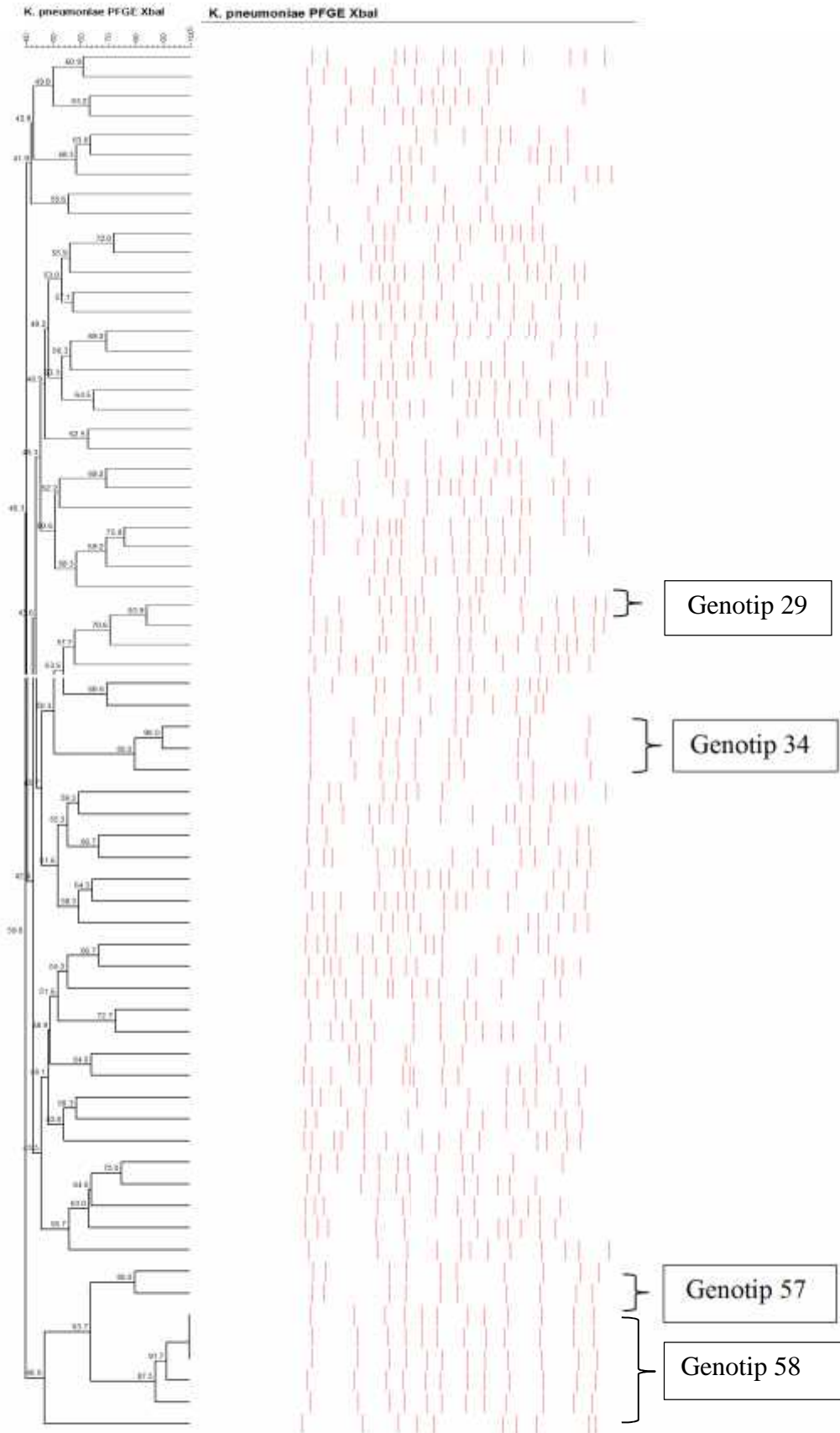
**ekil 14.** *Klebsiella pneumoniae* su larının PFGE görüntüsü.

OXA-48 pozitif olan 51 adet su 44 adet farklı genotip profili göstermi tir. Bunlardan dört tanesi genotip 58 içerisinde toplanmı ; genotip 34 de 3 adet, genotip 57 ve genotip 29 içerisinde ise 2' er adet su toplanmı tir.

NDM pozitif olan 11 adet su 11 farklı genotip profili göstermi tir. zolatların hiçbirini bir kümeye dahil olmamı tir.

VIM pozitif olan 3 adet su 3 farklı genotip profili göstermi tir. zolatların hiçbirini bir kümeye dahil olmamı tir.

Altı dokuz *K.pneumoniae* izolatının, Pearson korelasyon katsayısı ve “unweighted pair-group method with arithmetic mean” (UPGMA) kümeleme metodu kullanılarak yapılmı dendogram analizi ekil 14'de gösterilmi tir.



**Şekil 15.** Altmış yedi *K. pneumoniae* izolatının GelCompar 6.2 yazılımı ile edilen izolatlar arası klonal ilişkisini gösteren dendrogram. Altmış yedi *K.pneumoniae* suşunda 59 farklı genotip bulunmuştur.

## 5.TARTI MA VE SONUÇ

Karbapenemler, çoklu ilaca dirençli Gram negatif etkenlere karşı günümüzde kullanılan son seçenek beta-laktam antibiyotiklerdir. Üstün in vitro ve in vivo etkinlikleri, hemen hemen her ya grubunda uygulanabilmeleri, önemli bir yan etki veya organ fonksiyon bozukluğuna neden olmamaları, neredeyse tüm enfeksiyon tiplerinde kullanılabilir olmaları ve monoterpiye sadı yüksek ba arı bu ilaçların klinikte vazgeçilmez olmasının en önde gelen nedenleridir (143). Ancak, 1980'li yıllardan sonra tüm dünyada hızla yayılan genilemi spektrumlu beta-laktamaz enzimleri nedeniyle karbapenemlerin kullanım miktarı önemli düzeyde artmış ve 1990'lı yılların başından itibaren plazmid kaynaklı karbapenem hidrolize eden enzimler tanımlanmaya başlanmıştır (144). Günümüzde ise yaklaşık yedi farklı alelde 500'den fazla karbapenem hidrolize eden beta-laktamaz enzimi tanımlanmış olup bunlardan sınıf D karbapenemazlardan olan OXA grubu 300'den fazla varyanta sahip olarak en geniş aileyi oluşturmaktadır (145).

Hastane kökenli patojenlerde antimikrobiyal direnç sık görülen ciddi bir problemdir. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinde antibiyotik direncinin artmasıyla çoklu ilaç direnci gösteren türler yaygın bir şekilde görülmeye başlamıştır. Dirençli bakteri türlerinin hastane dışına yayılması önemli bir halk sağlığı problemi olmasının yanı sıra bu bakterilere karşı korunmak ve kontrolü için multidisipliner bir yaklaşım gerektirmektedir. Bu uygulamalarda etkin laboratuvar çalışmalarına ihtiyaç vardır (146).

Gram negatif bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde birinci seçenek olarak kullanılan laktam antibiyotiklere karşı en sık görülen direnç mekanizması, antibiyotiklerin laktam halkasının parçalanmasıyla antibiyotik etkinliğinin yitirilmesidir. Bakteriler bu genilemi laktamazlar üretilen ortama salarak yaparlar. Karbapenemazlar, imipenem ve meropenem gibi beta-laktam yapısında bulunan antibiyotikleri hidrolize eden laktamazlardır. Karbapenemazlar, sıklıkla *Klebsiella* olmak üzere *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* ve *Morganella* cinslerinde görülmektedir (147).

*Klebsiella spp.*, *Enterobacteriaceae* ailesi içinde bulunun önemli bir insan patojenidir. Saprofit ve sıklıkla çevresel bir tür olan *Klebsiella*'nın neden olduğu kan enfeksiyonlarının % 70'inden *K. pneumoniae* sorumludur (148). *Klebsiella pneumoniae*, fırsatçı patojen olarak özellikle gastrointestinal sistemde, nazofarenkste, ciltte bulunmakta ve özellikle immün yetmezlikli olan veya başka enfeksiyonlar sonucunda immün sistemi zayıflamış kişilerde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Hipervirulan *K. pneumoniae* suşları, sağlıklı kişilerde de nekrotizan pnömoni, piyojenik karaciğer absesi, endojenik endoftalmit, nekrotizan fasiit, menenjit gibi çeşitli toplum kaynaklı enfeksiyonlara yol açmaktadır (149,150). *Klebsiella*

*pneumoniae*'nin fırsatçı patojen olarak gastrointestinal sistemde kolonize olması özellikle, idrar yolu enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, kan enfeksiyonları gibi hastane kaynaklı enfeksiyonlar gelişmesine neden olmaktadır (151). Biyofilm oluşumuyla kateter enfeksiyonlarına yol açtığı da gösterilmiştir (152). Hastane kaynaklı enfeksiyonlarının oluşmasında *K. pneumoniae*'nin biyofilm oluşumu olarak konak immün yanıtından kaçması, antibiyotiklerin etkisinden korunması ve enfeksiyona sebep olan suşların sıklıkla ESBL ve karbapenemazlar gibi enzimler salgılayan çoklu ilaç direncine sahip olması gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (153).

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ; WHO) 2014 antibiyotik direnci araştırması raporunda insan hayatını tehdit eden enfeksiyonlara sebep olan *K. pneumoniae* türlerinin hızla direnç geliştirdiği ve bu direncin dünyanın pek çok bölgesinde yaygın bir şekilde görüldüğü belirtilmiştir (154). *Klebsiella pneumoniae*'nin özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda, pnömoni, kanyolu enfeksiyonları, yenidoğan ve yoğun bakım ünitesindeki hastalarda önemli rol oynadığı bilinmektedir. *Klebsiella pneumoniae*'nin sebep olduğu bu enfeksiyonlar nedeniyle tedavi edilen hastaların yarısından fazlasında karbapenem karşı geliştirmiş olan direnç nedeniyle tedavide karbapenem grubu antibiyotiklerin kullanılmadığı bildirilmiştir. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları ile oluşan kan enfeksiyonları %50'den fazla oranda mortalite ile sonuçlandırıldığı bildirilmektedir (155).

Karbapenemler, laktam grubu antibiyotiklerden olup genellikle çoklu ilaç direncine sahip Gram negatif basillerin tedavisinde tercih edilmektedir. Karbapenemlerin ESBL ve AmpC laktamazlara karşı stabiliteyi koruyabildikleri gösterilmiştir. Bununla birlikte son yıllarda hem nonfermenterlerde (*Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa*) ve hem de *Enterobacteriaceae* üyelerinde karbapenem direnci önemli düzeyde artmaktadır (156). Karbapenemlere direnç başlıca iki mekanizma ile oluşmakta olup bunlar; permeabilite defektlerine sebep olan porin kaybı ile birlikte Amp C veya ESBL laktamazların salgınması ve karbapenem hidrolizine sebep olan laktamazların gerçek karbapenemazların, salgınmasıdır (102).

Tayvan'da 2010'da yayınlanan bir çalışmada karbapenem dirençli 100 *K. pneumoniae* suşundan sadece 6 tanesinin karbapenemaz ürettiği saptanmış, geri kalan 78 suşa ise plazmid kaynaklı Amp C üretimi tespit edilmiştir (157).

Karbapenemazlar tüm dünyada yaygın olarak görülmektedir (158,159). Üretilen karbapenemaz enzimleri genellikle birçok farklı grup laktam antibiyotikini hidrolize etmekle birlikte bu enzimleri kodlayan gen paketleri içinde aminoglikozitler, flouokinolonlar, SXT gibi beta laktam olmayan antibiyotiklere karşı da direnç oluşumunu

sa layan genlerin ta ındı ı gösterilmi tir (160). Bunun sonucunda çoklu ilaç direnci mevcut olan su ların tedavisi daha da zorla mı tır (161).

Bu çalı mada, Ülkemizin en büyük yo un bakım kapasitesine sahip üniversite hastanelerinden biri olan Turgut Özal Tıp Merkezinde yakla ık 2.5 yıl boyunca klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak soyutlanan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında bu direncin moleküler mekanizmasının aydınlatılması amaçlanmı ve kökenler arasındaki genotipik yakınlık ara tırılmı tır. Böylelikle hem hastanemizde en sık görülen karbapenem direnç mekanizmalarının belirlenmesi ve hem de bu dirençlerin klonal mı yoksa horizontal gen transferleri ile mi yayıldı ının ortaya konulması hakkında veri sa lanması hedeflenmi tir. Çalı maya CLSI standartlarına göre ertapenem dirençli bulunan türler dahil edilmi tir. Elde edilen sonuçlara göre merkezimizde *Klebsiella* türlerinin yakla ık %3'ü karbapenem dirençli bulunmu ve bu izolatların çok büyük kısmının *OXA-48* yönünden pozitif oldu u görülmü tür. Bunu *NDM* türü beta-laktamazlar takip etmi ve *OXA-48* pozitif su ların yakla ık %8'i aynı zamanda *NDM* yönüyle de pozitif bulunmu tur. Di er taraftan çalı ılan su lar içinde *IMP* ve *KPC* türü karbapenemaz enzimlerine rastlanılmamı tır. Ara tırmamıza dahil olan izolatların yakla ık 1/3'ünün imipenem M K düzeyi duyarlı sınırın altında saptanmı ve toplam da ılımın oldukça geni bir aralıkta (0.125-32 µg/ml) oldu u anla ılmı tır. *OXA-48* pozitif su ların imipenem M K de erleri yine geni bir da ılım paterni gösterirken, *NDM* pozitif olan su ların M K düzeyleri oldukça yüksek bulunmu tur. Di er taraftan *VIM* pozitif bulunan 3 su un imipenem M K düzeyleri duyarlı sınırın altında saptanmı tır ( ekil 13). Ayrıca, ara tırılan direnç genlerinden hiçbirinin tesbit edilmedi i 2 su da imipenem M K de eri dirençli sınırlar üzerinde bulunmu tur. Bu da bize karbapenem direnç mekanizmalarının çok çe itli oldu unu ve bizim çalı mı oldu umuz be karbapenemaz enzimi dı ındaki karbapenemaz direnç mekanizmalarının bu su larda söz konusu olabilece ini dü ündürtmü tür. Ayrıca, daha önce Wassef ve arkadaşlarının yaptı ı çalı mada bildirildi i üzere Amp C laktamazlarla birlikte Omp 35/36 proteinlerinin azalmasının *K. pneumoniae*'da imipenem direncinde etkili oldu u gözlenmi tir (162). Özellikle Amp C laktamazlar porin defektleriyle birlikte karbapenem direncine yol açabildi i bilinmektedir.

Izolatların genetik yakınlıkları dikkate alındı ında, çalı maya alınan su ların oldukça heterojen bir genotipik da ılım gösterdi i ortaya çıkmı tır. Tiplendirilen 67 su toplam 59 farklı klon olu turmu ve bunlardan en kalabalık klonun 5 izolat içerdi i, di er üç klonun ise sırasıyla 3 ve 2 izolat içerdi i görülmü tür. Çalı ma süresince bir salgının olmaması bu durumun en önemli nedeni olarak görülmü tür. Di er taraftan, hastanemizde direnç geni

ta ıyan birçok farklı su bulundu u; bunların gerek hastane florasında ve gerekse hastalarımızın geni bir co rafi bölgeden gelmesi nedeniyle birikti i dü ünülmü tür. Ancak yine de, mevcut veriler ı ı nda *OXA-48*, *NDM* ve *VIM* gibi önemli karbapenemaz genlerinin hastane ortamında horizontal gen transfer mekanizmaları ile etkin olarak yayıldı ı dü ünülmü tür.

Low ve arkadaş ları tarafından (163) Malezya'da bir yıl süresince yapılan çalı mada 9 farklı genotip içinde 17 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su izole edilmi ve bunların *OXA-48*, *KPC*, *NDM*, *IMP* ve *NMD* üreticisi oldukları saptanmı tır. Bu çalı mada da bizim çalı mamızda buldu umuz sonuçlarla benzer olarak; *OXA-48* geni ta ıyan 4 su ertapenem dirençli iken imipenem M K düzeyleri duyarlı saptanmı tır.

*KPC* laktamazlar ilk defa 1996'da ABD görüldükten sonra hızla yayılmı tır. Özellikle orta Atlantik, Florida, Porto Riko gibi bölgelerde endemik olarak görülmektedir. ABD'de ulusal sa lık güvenlik a mının bildirdi ine göre 2006 ile 2010 yılları arasında hastanelerde karbapenem dirençli *Klebsiella spp.*'ye ba lı hastane kaynaklı enfeksiyonların prevalansında %12 'lik artı tespit edilmi tir (164). ABD'den sonra *KPC*'nin ilk tesbit edildi i ülke srail olmu tur ve *KPC* üreten *Klebsiella pneumoniae* türünün ABD'de tesbit edilen su ile genetik olarak yakın ili kili oldu u gösterilmi tir. Bu direnç, Yunanistan'da ilk defa 2007'de bir hastanede tesbit edilmi , daha sonra 2012'de ERAS-Net'in yaptı ı sörveyans çalı masında saptanan *K. pneumoniae* su larının % 60,5'inin karbapenemlere dirençli oldu u bildirilmi tir. Çin, Brezilya ve Kolombiya'da da *KPC* üreten *K. pneumoniae* kökenleri rapor edilmi tir (165). Ba ta ABD olmak üzere Avrupa ülkelerinde ve Çin'de en sık tespit edilen karbapenemaz da yine *KPC* laktamazlardır. Çin'de 2015'de Rui ve arkadaş larının yaptı ı çalı mada karbapenemaz dirençli *Enterobacteriaceae*'lar da en sık *KPC-2* izole edilmi tir (166). *KPC-2*, Türkiye'de ise sadece bir su ta bulunmu tur. Bu hasta pnömoni tanısıyla tedavi edilmi , trakeal aspirat kültüründe *KPC* üreten *K. pneumoniae* izole edilmi , daha sonra da sepsis sonucu hasta kaybedilmi tir (167). Kasım 2012'de stanbul'da saptanan vakada hastanın Romanya'dan transfer edilmi olması nedeniyle etkenin bu hastada daha önce kolonize olmu olabilece ini dü ündürmü tür. Bu tarihten sonrada Türkiye'de *KPC* geni bildirilmemi tir. Çakar ve arkadaş larının 2016' da Türkiye'de yaptı ı çok merkezli çalı mada da karbapenem dirençli geni tesbit edilen 143 *Enterobacteriaceae* su unda *KPC* genine rastlanılmamı tır (168). Yapmı oldu umuz bu çalı mada da yakla ık 30 ayda toplanmı olan 70 su içinde bu geni ta ıyan izolata rastlanılmamı tır.

New Delhi laktamaz olarak bilinen *NDM* laktamazlar, sınıf B metallo laktamaz grubundandır. *NDM* beta laktamazlar, *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de sıklıkla görülmekle



birlikte nadiren *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'de de görülmektedir. *KPC* grubundan farklı olarak penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize edebilmesine rağmen aztreonamı hidrolize etmezler (169). *NDM* ile birlikte sıklıkla diğer direnç mekanizmaları, özellikle Amp C tipi laktamazlar ve permeabilite defektleri görülmektedir. Bu direnç mekanizmalarının birlikte bulunması sonucu aztreonam direnci de sıklıkla görülmektedir (170). *NDM* geni hem kromozomal kaynaklı hem de plazmid kaynaklı olabilmektedir. Bu enzim ilk defa 2008'de Yeni Delhi'den dönen sveç'li bir hastada izole edilmiştir (171). *NDM* üreten suşları ilk görülmesinden itibaren hızla yayılmış dünyada her bölgeden rapor edilmeye başlamıştır. Özellikle, Hindistan, Pakistan, ABD ve Balkan ülkelerinde daha sık olarak izlenmektedir. Türkiye'de de çok çeşitli merkezlerce *NDM* üreten *Klebsiella pneumoniae* suşları bildirilmiştir (172). Karaaslan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada karbapenem dirençli 176 suşta *NDM* ikinci en sık tespit edilen karbapenem direnç geni olmuştur (173). Şahin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise karbapenem dirençli 43 suşun yedisinde *OXA-48*, bir tanesinde de *NDM* geni izole edilmiştir (174). Çakar ve arkadaşlarının çalışmasında karbapenemaz direnç geni tesbit edilen 143 suşta tek başına *NDM* görülme oranı %6,2 *OXA-48* ile birlikte görülme oranı % 2,1 tespit edilmiştir. Ülkemizde *OXA-48* 'den sonra en sık görülen karbapenemaz geninin *NDM* olduğu gösterilmiştir (168).

Türkiye'de yaygın bir şekilde *OXA-48* varlığı *NDM*'nin yayılmasıyla iki geni de barındıran suşların ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu tedavi seçeneklerinin daralmasına ve morbiditenin uzamasına yol açmıştır. Nitekim bizim çalışmamızda da 70 suşun 11 tanesinde *NDM* pozitifliği bulunmuş ve *OXA-48*'den sonra ikinci sıklıkla görülen karbapenemaz geni olduğu görülmüştür. Aynı zamanda *NDM* pozitif suşların 4'ünde *OXA-48* ile birliktelikleri izlenmiş olup bu da ülkemizde yapılmış olan diğer çalışmaları destekler niteliktedir. Bizim çalışmamızda *OXA-48* ile birlikte bulunan suşlarında diğer *NDM* pozitif suşları imipenem dirençli bulunmuştur.

*OXA-48* karbapenemazlar, D grubu laktamaz sınıfındandır. İlk defa 2001 yılında İstanbul'da 54 yaşında, yanık ve üriner enfeksiyon sebebiyle hastanede tedavi gören bir hastada izole edilmiştir (175). Şimdi birçok Avrupa ülkesinde ve Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkelerinde endemik olarak görülmektedir (176). Türkiye'de *K. pneumoniae*'de baskın olarak bulunan karbapenemaz geni *OXA-48* olarak saptanmıştır ve buna bağlı salgınlar bildirilmiştir (177). *OXA-48* geni genellikle tek bir plazmidle taşınmakta ve *Enterobacteriaceae* ailesindeki suşlar ve türler arası taşınmadan sorumlu tutulmaktadır (178). Bu plazmid IncL/M-tip 63-kb'lık olup hızlı konjugasyon yapabilen bir plazmidir (178). Genellikle *OXA-48* geninin taşınmasından IS1999 elementi sorumludur (179). *OXA-48* karbapenemazlar zayıf karbapenemaz

aktivitesine sahiptir ve karbapenemleri, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinleri zayıf hidrolize etmektedir. Ancak *OXA-48* ile birlikte ESBL ve Amp C enzimlerini bulunduran suşlar tüm beta laktamlara dirençli olabilmektedir (180).

Akta ve arkadaşlarının 2004-2005 yılları arasında 162 *K. pneumoniae* suşu arasında yaptığı çalışmada sadece uzun süre hastanede yatan ve meropenem ile tedavi edilen iki hastada *OXA-48* tesbit edilmiştir (181). Us ve arkadaşlarının 2004-2007 yılları arasında yaptığı çalışmada ise *K. pneumoniae* suşlarının %26,9'unda *OXA-48* tespit edilmiştir (182). Yine ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada klinik numunelerden elde edilen *Enterobacteriaceae* ailesinden olan izolatlarda karbapenem direnç genlerinin %86'sı *OXA-48*, %10,5 *NDM* ve %3,5'i ise *VIM* genleri olarak bulunmuştur (183). Alp ve arkadaşları, 2010-2011 arasında karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları arasında *OXA-48* gen sıklığını %91,5 olarak tespit etmişlerdir (184). Bizim çalışmamızda da çalışılan suşlar arasında en sık rastlanılan karbapenemaz geni *OXA-48* olmuştur. *OXA-48* tesbit edilen 51 suşun 17'si CLSI kriterlerine göre karbapenemlere duyarlı tespit edilmiştir. Bu da bize karbapenem direncinde *OXA-48* ile birlikte ESBL enzimlerinin ve porin defektlerinin, effluks sistemlerinin bulunmasının önemli role sahip olduğunu düşündürmektedir.

Metallo beta laktamazlardan olan *IMP* enzimleri Avrupa'da Türkiye ve Yunanistan'da *Klebsiella pneumoniae* suşlarında görülmektedir. *IMP* üreten *K. pneumoniae* suşları sıklıkla ST11 tipinde olmakta, beraberinde ESBL ve plazmid kaynaklı Amp C enzimlerini de üretmektedir. *IMP*'nin sebep olduğu salgınlar çoğunlukla ağır hastalardan veya nemli ortamlardaki rezervuarlardan kaynaklanmaktadır. *IMP* üreten *Enterobacteriaceae* rezervuarları yanık ünitesindeki banyolar, yoğun bakım ünitesinde drenler, inkübatörler, tuvaletler, mekanik ventilatörler olabilmektedir. İnsanlarda ve hayvanlarda *IMP* fekal taşıyıcılığı kolonize yiyeceklerin yenmesi sonucu sporadik olarak tanımlanmıştır. Amerika ve Tunus'da nehir sularında bazı izolatlar tespit edilmiştir (185). Bununla birlikte sağlık çalışanlarının eliyle meydana gelen bir salgın görülmesine rağmen sağlık çalışanlarında kolonizasyon saptanmamıştır (186). Bizim çalışmamızda *IMP* geni, çalışılan suşların hiçbirinde bulunmadı.

Verona Integron Metallo beta laktamaz (*VIM*) üreten *Enterobacteriaceae* suşları Avrupa'da, özellikle Yunanistan'da, sık görülmektedir (187). En sık görülen varyant *VIM-1* enzimi olup bu gen *Enterobacteriaceae* ailesinde; *VIM-2* ise *P.aeruginosa*'da görülmektedir (97).

Çeşitli karbapenemazların karbapenemleri hidroliz etme etkinlikleri farklı olabilmektedir. Özellikle metallo beta laktamazlar ve *KPC* enzimleri karbapenemleri *OXA-48* enzimlerine göre daha etkin bir şekilde hidroliz etmektedir. Bununla birlikte yüksek düzeyde karbapenem

direnci gösteren *K. pneumoniae* su ları incelendi inde karbapenemaz üretilmesine ilaveten üretilen karbapenemaz tipine bakılmaksızın permeabilite defektlerinin olduğu gösterilmiştir. Buna karşın düşük M K düzeylerinde (4-16 µg/ml) direnç gösteren *K. pneumoniae* su larında da farklı tiplerde karbapenemaz enzimleri tanımlanmıştır. KPC enzimlerinin 1990'larda ABD'de görülmeye başladığı ve Yunanistan'da V M enziminin yayılmaya başladığı tarihlerde *K. pneumoniae* su ları karbapenemaz üretmesine rağmen permeabilite modifikasyonları olmadığında düşük M K düzeyleri gösterdikleri tespit edilmiştir (188).

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* su larının artması ve bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan güçlü ilaçlar, mortalite oranını tüm dünyada (189,190) olduğu gibi bizim ülkemizde de artırmaktadır (177). Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin tedavisinde kullanılabilen antibiyotikler, bazı aminoglikozidler, polimiksinler, tigesiklin, fosfomisin ve temosilinle kısıtlanmıştır. Bu ajanların farmakolojik özellikleri, yan etkileri, verili yolu ve en önemlisi etkinliklerinin istenilen düzeyde olmaması tedavi seçeneklerini önemli ölçüde kısıtlamaktadır. Aminoglikozid ve polimiksinlerin kullanımını kısıtlayan en önemli yan etki nefrotoksisitedir. Ayrıca, aminoglikozitlerin monoterapi uygulaması bulunmamaktadır. Artmış direnç ve düşük kan düzeyleri tigesiklinin kullanımını kısıtlayan faktörlerdendir. Fosfomisin, idrar yolu enfeksiyonlarında oral formunun kullanılabilmesine rağmen özellikle bilinci kapalı yoğun bakım hastalarında veya oral alımı kapalı kişilerde parenteral kullanımını sağlayacak başka bir formu bulunmamaktadır. Diğer taraftan, bu ilacın özellikle hayatı tehdit eden ciddi enfeksiyonlardaki etkinliği hakkında halen fazla bir veri bulunmamaktadır (191). Tüm bu olumsuzluklar nedeniyle karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu kan dolaşımı, menenjit ve pnömoni gibi ciddi enfeksiyonlarda saptanan etken karbapenemlere karşı in vitro dirençli görülse de imipenem veya meropenem kemoterapiye dahil edilmektedir. Ancak, elde edilen veriler çok yüz güldürücü bulunmamıştır (191).

Bu çalışmada elde ettiğimiz sonuçlar ve günümüze kadar yayınlanmış bilimsel literatürde değerlendirildiğinde, son 20 yılda karbapenem direncinin hızla arttığı görülmektedir. Bu dirence neden olan birçok farklı mekanizma mevcut olup zaman içinde bunların daha da çoğaltılarak artacağı öngörülebilmektedir. Karbapenem direncinin veya bu direnci taşıyan su ların yayılımının azaltılması günümüzün en kritik konularından biri haline gelmiştir. Bu grup antibiyotiklere direnç gelişiminin engellenmesinde uygun antibiyotik kullanım politikalarının geliştirilmesi ve titiz bir şekilde uygulanması yüksek derecede önem sahiptir. Bu amaçla gereksiz antibiyotik kullanımlarının engellenmesi, cerrahi profilaksi rehberlerine uyum gösterilmesi, ampirik tedavilerde olabildiğince yüksek potansli antibiyotik kullanımının

kısıtlanması ve karbapenemler gibi son seçenek antibiyotiklerin kullanımında kültür ve antibiyogram sonuçlarına dikkat edilmesi gerekmektedir. Diğer taraftan, dirençli su ların özellikle hastanelerde yayılımının azaltılması için el hijyeninin sağlanması, temas-izolasyon önlemlerinin uygulanması, etkin sürveyans çalışmalarının devamlı surette yapılması ve sonuçların hastane enfeksiyon kontrol komitesince takibi ve cerrahi alet ve tekrar kullanılabilir tıbbi gereçlerin standartlara uygun bir şekilde sterilizasyon ve dezenfeksiyonunun sağlanması önem taşımaktadır (192).

Yapılan çalışmada umuz bu çalışma yaklaşık 30 aylık bir süre içinde bir üniversite hastanesinde saptanan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında karbapenem direncinin moleküler mekanizmaları araştırılmıştır. Bu dirence neden olabilecek porin defektleri ve pompa sistemlerinin bu çalışmaya kapsamına alınmaması araştırmanızın en önemli eksiklikleri olarak görülebilmektedir. Ancak, bu çalışma ile elde edilen veriler hastanemizde karbapenem direncinin çeşitliliği ve yayılım dinamikleri hakkında önemli bilgiler sunmuştur. Buna göre, *OXA-48* hastanemizde saptanan en önemli karbapenem direnç enzimi olduğu bunu *NDM* türü metallo enzimler takip etmiştir. Yukarıda da belirtildiği üzere, Ülkemizden bildirilen *OXA-48* ve *NDM* birlikteliği bu çalışmada da saptanmış ve çalışma maya alınan tüm su ların yaklaşık %5'inde bu iki direnç mekanizması birlikte bulunmuştur. *VIM* türü metallo enzimler ise çalıştığımız su lar arasında daha az görülen bir karbapenem direnç mekanizması olarak bulunmuştur, *KPC* ve *IMP* türü enzimlere ise rastlanılmamıştır. Yapılan genotipik analiz sonucunda karbapenem dirençli su ların oldukça heterojen bir grup olduğunu ve aralarında klonal ilişkinin çok az bulunduğunu görülmüştür. Buna göre, hastanemizdeki su lar arasında karbapenem direncinin vertikal yayılımdan çok horizontal gen transferleri aracılığıyla yayıldığı düşünülmüştür.

*Klebsiella pneumoniae* başta olmak üzere diğer enterik basillerde ve nonfermenter gram negatif bakterilerde karbapenem direnci gittikçe artan bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Bu soruna karşı gerekli önlemlerin alınması için moleküler epidemiyolojik çalışmalar ile sorunun belirlenmesi ve bu soruna özgü ve daha etkin önleyici tedbirlerin alınmasına gereksinim bulunmaktadır.

## 8.KAYNAKLAR

1. Carvalhaes G.C, Cayo R, Gales A.C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit: a real challenge to physicians, scientific community and society. Shock Society 2013; 39 (7): 32-37.
2. Töנגden T, Giske C.G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. J Intern Med 2015; 277: 501–512.
3. Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, Benedi VJ, Jacoby GA. Roles of  $\beta$ -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(7): 1669-1673.
4. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Treccarichi EM, Posteraro B, Fiori B, Citton R, D'Inzeo T, Fadda G, Cauda R, Spanu T. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. Antimicrob agents chemotherapy 2007; 51: 1987-1994.
5. Pitout D. D, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance American Society for Microbiology. Antimicrob Agents Chemother 2015; doi:10.1128/AAC.01019-15
6. Winn W, Allen S, Janda W, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. Tribe *Klebsiella*: Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Chapter 6. Yedinci baskı. Wolters Kluwer. 2017; 1: 259-264.
7. [http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella\\_pneumoniae\\_2.jpg](http://klebsiella-pneumoniae.org/klebsiella_pneumoniae_2.jpg) ula ım tarihi:14.08.2016
8. Mahon C.R, Lehman D.C, Manuselis G. *Enterobacteriaceae*: Textbook of Diagnostic Microbiology. Üçüncü baskı. 2007; 1: 512-513.
9. Podchun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. Clinical microbiology reviews 1998; 11(4): 589–603.
10. Podschun R, and H. Sahly. Hemagglutinins of *Klebsiella pneumoniae* and *K. oxytoca* isolated from different sources. Zbl. Hyg. Umweltmed. 1991; 191(1): 46–52.
11. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assesment of the role of fimbriae in pathogenecity. Infect Immun 2009;77(11):5016-5024.

12. Rosen DA, Pinkner JS, Walker JN, Elam JS, Jones JM, Hultgren SJ. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* fim H affect function and pathogenesis in the urinary tract. *Infect Immun* 2008; 76(7): 3346–3356.
13. 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): 4055–4065.
14. Ong C.L, Beatson S.A, Totsika M, Forestier C, McEwan A.G, Schembri M.A. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species .*BMC Microbiol* 2010; 10: 83.
15. Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 fimbrial shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial adhesin (MrkD), facilitates biofilm formation. *Infect Immun* 2001; 69:5805–5812
16. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol* 2012; 7(8): 991–1002.
17. Schroll C, Barken K.B, Krogfelt K.A, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol* 2010;10: 179.
18. Stahlhut SG, Struve C, Krogfelt KA, Reisner A. Biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2012;65(2): 350–359.
19. Wu CC, Huang YJ, Fung CP, Peng HL. Regulation of the *Klebsiella pneumoniae* Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpcI. *Microbiology* .2010; 56(Pt 7): 1983–1992.
20. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J. Med. Microbiol.* 2010;59(Pt 5): 541–547.
21. Di Martino P, Livrelli V, Sirot D, Joly B, Darfeuille-Michaud A. A new fimbrial antigen harbored by CAZ-5/ SHV-4 producing *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect. Immun.* 1996; 64(6) : 2266–2273.
22. Ørskov I and F. Ørskov. Serotyping of *Klebsiella*. *Methods Microbiol.*1984; 14: 143–164.
23. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Biochem.* 2006; 75: 39–68.
- 24- Ramos PI, Picao RC, Vespero EC et al. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. *BMC Microbiol.* 2012;12;173.
25. Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59(Pt 5): 541–547.

26. Pan YJ, Lin TL, Chen YH et al. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. PLoS ONE 2013; 8 (12): e80670.
- 27- Rahn A, Drummelsmith J, Whitfield C. Conserved organization in the *cps* gene clusters for expression of *Escherichia coli* group 1 K antigens: relationship to the colanic acid biosynthesis locus and the *cps* genes from *Klebsiella pneumoniae*. J. Bacteriol.1999; 181(7): 2307–2313.
28. Bei L, Yuling Z, Changting L, Zhenhong C, Dongsheng Z. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. Future Microbiol. 2014; 9(9): 1071–1081.
29. Cortes G, Borrell N, De Astorza B, Gomez C, Sauleda J, Alberti S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. Infect. Immun. 2002; 70(5): 2583–2590.
30. Pan YJ, Lin TL, Hsu CR, Wang JT. Use of a *Dictyostelium* model for isolation of genetic loci associated with phagocytosis and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 2011; 79(3): 997–1006.
31. Sahly H, Podschun R, Oelschlaeger TA et al. Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 2000; 68(12): 6744–6749.
32. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A et al. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. Infect. Immun. 2010;78(1): 210–219.
33. Wu JH, Wu AM, Tsai CG, Chang XY, Tsai SF, Wu TS. Contribution of fucose-containing capsules in *Klebsiella pneumoniae* to bacterial virulence in mice. Exp. Biol. Med. (Maywood). 2008; 233(1): 64–70.
34. Lawlor MS, Handley SA, Miller VL. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. Infect. Immun. 2006; 74(9): 5402–5407.
35. Regueiro V, Campos MA, Pons J, Alberti S, Bengoechea JA. The uptake of a *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide mutant triggers an inflammatory response by human airway epithelial cells. Microbiology. 2006;152(Pt 2): 555–566.
36. Llobet E, Tomas JM, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide is a bacterial decoy for antimicrobial peptides. Microbiology 2008; 154(Pt 12): 3877–3886.
37. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompant CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. Infect.Immun. 2004; 72(12): 7107–7114.
38. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. J. Biol. Chem. 2001; 276(8): 5707–5713.

39. Harder J, Meyer-Hoffert U, Teran LM et al. Mucoid *Pseudomonas aeruginosa*, TNF-alpha, and IL-1 beta, but not IL-6, induce human beta-defensin-2 in respiratory epithelia. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2000, 22(6): 714–721.
40. Moranta D, Regueiro V, March C et al. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect. Immun.* 2010; 78(3): 1135–1146.
41. Hansen DS, Mestre F, Alberti S et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. *J. Clin. Microbiol.* 1999 ; 37(1): 56–62.
42. Hsieh PF, Lin TL, Yang FL et al. Lipopolysaccharide O1 antigen contributes to the virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscess. *PLoS ONE.* 2012; 7(3): e33155.
43. Merino S, Altarriba M, Izquierdo L, Nogueras MM, Regue M, Tomas JM. Cloning and sequencing of the *Klebsiella pneumoniae* O5 *wb* gene cluster and its role in pathogenesis. *Infect. Immun.* 2000; 68(5): 2435–2440
44. Alvarez D, Merino S, Tomas JM, Benedi VJ, Alberti S. Capsular polysaccharide is a major complement resistance factor in lipopolysaccharide O side chain-deficient *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Infect. Immun.* 2000; 68(2): 953–955.
45. March C, Cano V, Moranta D et al. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PLoS ONE.* 2013; 8(2): e56847.
46. Regue M, Izquierdo L, Fresno S et al. A second outer-core region in *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide. *J. Bacteriol.* 2005; 187(12): 4198–4206.
47. Wu KM, Li LH, Yan JJ et al. Genome sequencing and comparative analysis of *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044, a strain causing liver abscess and meningitis. *J. Bacteriol.* 2009; 191(14): 4492–4501.
48. Izquierdo L, Coderch N, Pique N et al. The *Klebsiella pneumoniae wabG* gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. *J. Bacteriol.* 2003; 185(24): 7213–7221.
49. Clements A, Tull D, Jenney AW et al. Secondary acylation of *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide contributes to sensitivity to antibacterial peptides. *J. Biol. Chem.* 2007; 282 (21) ; 15569–15577.
50. Liobet E, Campos MA, Gimenez P, Moranta D, Bengoechea JA. Analysis of the networks controlling the antimicrobial-peptide-dependent induction of *Klebsiella pneumoniae* virulence factors. *Infect. Immun.* 2011; 79(9): 3718–3732.
51. Bachman MA, Miller VL, Weiser JN. Mucosal lipocalin 2 has pro-inflammatory and iron-sequestering effects in response to bacterial enterobactin. *PLoS Pathog.* 2009; 5(10): e1000622.



52. Russo TA, Shon AS, Beanan JM et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than 'classical' *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence. PLoS ONE. 2011; 6(10): e26734.
53. Liobet E, March C, Gimenez P, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* OmpA confers resistance to antimicrobial peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53(1): 298–302.
54. Tsai YK, Fung CP, Lin JC et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob. Agents Chemother. 2011; 55(4): 1485–1493.
55. Garcia-Sureda L, Domenech-Sanchez A, Barbier M, Juan C, Gasco J, Alberti S. OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 2011; 55(10): 4742–4747.
56. Srinivasan VB, Venkataramaiah M, Mondal A, Vaidyanathan V, Govil T, Rajamohan G. Functional characterization of a novel outer membrane porin KpnO, regulated by PhoBR two-component system in *Klebsiella pneumoniae* NTUH-K2044. PLoS ONE. 2012; 7(7): e41505.
57. Padilla E, Liobet E, Domenech-Sanchez A, Martinez-Martinez L, Bengoechea JA, Alberti S. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. Antimicrob. Agents Chemother. 2010; 54(1): 177–183.
58. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. J Hosp Infect. 1998; 38: 119-590 132.
59. Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. F1000 Prime Rep. 2014; 6:64.
60. Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome. Lancet Infect Dis. 2012;12: 881-887.
61. Lin W.H, Kao C.Y, Yang D.C, Tseng C.C. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014; 33:1533–1539.
62. Wen-Neng Chang, Chi-Ren Huang, Cheng-Hsien Lu, Chun-Chih Chien. Adult *Klebsiella pneumoniae* Meningitis in Taiwan: An Overview. Acta Neurol Taiwan. 2012;21:87-96
63. Bennett J.E, Dolin R, Blaser M.J. Principles and Practice of Infectious Diseases. Sekizinci baskı.Elsevier Saunders.Chapter 1.2015;1:73.
64. Piednoir E, Thibon P, Borderan GC, et al. Long-term clinical and economic benefits associated with the management of a nosocomial outbreak resulting from extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Crit Care Med.2011; 39: 2672-7.
65. Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Trecarichi EM, Posteraro B, Fiori B, Citton R, D'Inzeo T, Fadda G, Cauda R, Spanu T. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*:

importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007; **51**: 1987-1994.

66. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, Tumietto F, Cristini F, Trapani F, Gaibani P, Viale P. *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infection: Epidemiology and Impact of Inappropriate Empirical Therapy. *Medicine (Baltimore)* 2014; **93**: 298-309.

67. Molton JS, Tambyah PA, Ang BS, Ling ML, Fisher DA. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. *Clin Infect Dis*. 2013; **56**: 1310-1318.

68. Van Duijn PJ, Dautzenberg MJ, Oostdijk EA. Recent trends in antibiotic resistance in European ICUs. *Curr Opin Crit Care*. 2011; **17**: 658-665.

69. Guérillot F, Carret G, Flandrois J.P. A statistical evaluation of the bactericidal effects of ceftibuten in combination with aminoglycosides and ciprofloxacin. *J. Antimicrob. Chemother.* 1993; **32**: 685–694.

70. Traub W.H, Schwarze I, Bauer D. Nosocomial outbreak of cross-infection due to multiple-antibiotic-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Characterization of the strain and antibiotic susceptibility studies. *Chemotherapy*. 2000; **46**: 1–14.

71. Morrill J.H, Pogue J.M, Kaye S.K. Treatment Options for Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Infections. 2015. DOI: 10.1093/ofid/ofv050

72. Brunton L.L. Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Onikinci baskı. Chapter 53. 2011.

73. Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem*. 2009; **16**: 564–575.

74. Tangden T, Giske C. G. Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J InternMed*. 2015; **277**: 501–512.

75. Tsai YK, Fung CP, Lin JC, Chen JH, Chang FY, Chen TL, et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; **55**: 1485–1493.

76. Zhang Y, Jiang X, Wang Y, Li G, Tian Y, Liu H, et al. Contribution of  $\beta$ -lactamases and porin proteins OmpK35 and OmpK36 to carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; **58**: 1214–1217.

77. Hernández-Allés S, Conejo Md, Pascual A, Tomás JM, Benedí VJ, Martínez-Martínez L. Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2000; **46**: 273–277.

78. Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. Role of efflux pumps inhibitor in decreasing antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in North India. *J Infect Dev Ctries* 2015; 9(8): 815-820.
- 79- Blair J. MA, Piddock L.JV. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology*. 2009; 12: 512–519.
80. Hasdemir U, Chevalier J, Nordmann P, Page J.M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(6): 2701–2706.
81. Saw H, Webber M. A, Mushtaq S, Woodford N, Piddock L. J. V. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. *J Antimicrob Chemother* 2016; 10.1093: 1-10.
82. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control* 2006; 34: S20–8,S64–73.
83. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile b-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–58.
84. Naas T, Vandel L, Sougakoff W, Livermore DM, Nordmann P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A b-lactamase, sme-1, from *Serratia marcescens* S6. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 1262–1270.
85. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum b-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 622–632.
86. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum b-lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(suppl 1): 42–52.
87. Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A b-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2598–2603.
88. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151–1161.
89. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25: 682–707.
90. Cuzon G, Naas T, Truong H et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce b-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 1349–1356.

91. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*. 2010; 300 (6): 371-379.
92. Cuzon G, Naas T, Truong H et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces  $\beta$ -lactamase blaKPC-2 Gene. *Emerging Infectious Diseases*. 2010 ;16(9): 1349-1356.
93. Naas T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2008; 52: 1257–1263.
94. Ito H, Arakawa Y, Ohsuka S, Wacharotayankun R, Kato N, Ohta M. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-b-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 824–829.
95. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-b-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584–1590.
96. Cornaglia G, Mazzariol A, Lauretti L, Rossolini GM, Fontana R. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo-b-lactamase. *Clin Infect Dis* 2000; 31: 1119–1125.
97. Poirel L, Naas T, Nicolas D et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-b-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 891–897
98. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007; 2: 501–512.
99. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T et al. KHM-1, a novel plasmid mediated metallo-b-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4194–4197.
100. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20:821-830.
101. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini G.M. Metallo-b-lactamases: a last frontier for b-lactams? *Lancet Infect Dis* 2011; 11: 381–393.
102. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 1791–1798.
103. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D b-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* .2010; 54: 24–38.
104. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48 like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother* . 2012; 67: 1597–1606.
105. Poirel L, Heritier C, Tolun V et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15–22.

106. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clinical Microbiology and Infection*. 2011; 17(12): E24-E26.
107. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ et al. Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151–1161.
108. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20: 821–830.
109. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 130–136.
110. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 785–796.
111. Baraniak A, Grabowska A, Izdebski R et al. Molecular characteristics of KPC-producing *Enterobacteriaceae* at the early stage of their dissemination in Poland, 2008–2009. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 5493–5499.
112. Potron A, Poirel L, Verdavaine D, Nordmann P. Importation of KPC-2-producing *Escherichia coli* from India. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 242–243.
113. Labarca J, Poirel L, Özdamar M, Turko lu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes and New Infections*. 2014; 2(2): 50-1.
114. Poirel L, Yilmaz M, Istanbulu A, Arslan F, Mert A, Bernabeu S, et al. Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014; 58(5): 2929-33.
115. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17: 1791–1798.
116. Aktas Z, Bal C, Midilli K, Poirel L, Nordmann P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;12(7):695-6.
117. Jeannot K, Guessennnd N, Fournier D, Muller E, Gbonon V, Plesiat P. Outbreak of metallo-b-lactamase VIM-2-positive strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the Ivory Coast. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2952–2954.
118. Jacobson RK, Minenza N, Nicol M, Bamford C. VIM-2 metallo-b-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* causing an outbreak in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 1797–1798.

119. Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Ghozzi R, Saidani M, Amine S, Ben Redjeb S. Nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase in a kidney transplantation unit. *Diagn Pathol* 2011; 6: 106.
120. Elias J, Schoen C, Heinze G et al. Nosocomial outbreak of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* associated with retrograde urography. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1494–1500.
- 121- Van der Bij AK, Van Mansfeld R, Peirano G et al. First outbreak of VIM-2 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Netherlands: microbiology, epidemiology and clinical outcomes. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 513–518.
122. Corvec S, Poirel L, Espaze E, Giraudeau C, Drugeon H, Nordmann P. Long-term evolution of a nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-2 metallo-enzyme. *J Hosp Infect* 2008; 68: 73–82.
123. Kassis-Chikhani N, Decre D, Gautier V et al. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaVIM-1 and blaSHV-5 in a French university hospital. *J Antimicrob Chemother* 2006; 57: 142–145.
124. Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) and NDM-6 producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 529–533.
125. Halaby H, Reuland AE, Al Naiemi N et al. A case of New Delhimetallo- $\beta$ -lactamase 1 (NDM-1)-producing *Klebsiella pneumoniae* with putative secondary transmission from the Balkan region in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2790–2791.
- 126- Mazzariol A, Bosnjak Z, Ballarini P et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*, Croatia. *Emerg Infect Dis* 2012; 18: 532–534.
127. Zowawi HW, Balkhy HH, Walsh TR, Paterson DL.  $\beta$ -Lactamase production in key gram-negative pathogen isolates from the Arabian peninsula. *Clin Microbiol Rev* 2013; 26: 361380.
128. Jamal W, Rotimi VO, Albert MJ, Khodakhast F, Udo EE, Poirel L. Emergence of nosocomial New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1) producing *Klebsiella pneumoniae* in patients admitted to a tertiary care hospital in Kuwait. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39: 183–184.
129. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012; 56(5): 2784-5.
130. Aktas Z, Bal Kayacan C, Schneider I et al. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-48 persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008; 54: 101–106.
131. Matar GM, Cuzon G, Araj F et al. Oxacillinase-mediated resistance to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* from Lebanon. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14: 887–888.

132. Poirel L, Carbonnelle E, Bernabeu S, Gutmann L, Rotimi V, Nordmann P. Importation of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* from Kuwait. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2051–2052.
133. Cuzon G, Naas T, Lesenne A, Benhamou M, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 b-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36:91–93.
134. Agabou A, Pantel A, Ouchenane Z et al. First description of OXA-48-producing *Escherichia coli* and the pandemic clone ST 131 from patients hospitalised at a military hospital in Algeria. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; 33: 1641–1646.
135. Pfeifer Y, Schlatterer K, Engelmann E et al. Emergence of OXA-48- type carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 2125–2128.
136. Potron A, Schrenzel J, Poirel L, Renzi G, Cherkaoui A, Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing *Enterobacteriaceae* in Switzerland. *J Antimicrob Agents* 2012; 40: 563–564.
137. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 130–136.
138. Clinical and laboratory standards institute (2015). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth Informational Supplement, CLSI document M100-S25, CLSI, Wayne PA.
139. South Med. Lippincott Williams & Wilkins. 2010.
140. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C. and Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67 (4): 906-909.
141. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007; 59 (2): 321-322.
142. Durmaz R, Otlu B, Koksall F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *J Infect Dis.* 2009; 62(5): 372-7.
143. Livermore DM. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2002; 3: 218-24
144. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:147-51
145. <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>

- 146- Seibert G, Hörner R, Meneghetti B.H. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing *enterobacteria* in a teaching hospital. *einstein*. 2014; 12(3): 282-6
147. Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(8): 2761-6.
148. Hansen DS, Gottschau A, Kolmos HJ. Epidemiology of *Klebsiella* bacteraemia: a case control study using *Escherichia coli* bacteraemia as control. *J Hosp Infect*. 1998; 38: 119-132.
149. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013; 4(2): 107–118.
150. Broberg CA, Palacios M, Miller VL.. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000 Prime Rep*. 2014; 6:64.
151. Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouveleki LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; 10: 1393-1404.
- 152- Schroll C, Barken KB, Krogfelt KA, Struve C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. *BMC Microbiol*. 2010; 10:179 .
153. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(9): 785–796.
154. Organization WHO 2014. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014, April 2014 ed, p 257. World Health Organization.
155. Abraham Borer M, Lisa Saidel Odes M, Klaris Riesenber M, Seada Eskira R MPH, Nejama Peled Ms, Ronit Nativ R MPH, Francisc Schlaeffer M, Michael Sherf M. Attributable mortality rate for carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009; 30: 972–976.
156. Jesudason M.V, Kandathil A.J, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase & metallo- $\beta$ -lactamase production in clinical isolates. *Indian Journal of Medical Research*. 2005; 121(6): 780-783.
157. Chiu S.K, Wu T.L, Chuang Y.C. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS ONE* .2013; 8(7): e69428. doi:10.1371/journal.pone.0069428
158. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini G.M. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 381–393.
159. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical Microbiology and Infection*. 2010; 16(2): 102-111.



160. Souli M, Galani I, Giamarellou H. Emergence of extensively drug-resistant and pan drug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveillance*. 2008; 13(47).
161. Giamarellou H, Poulakou G. Multidrug-resistant gram negative infections: what are the treatment options. *Drugs*. 2009; 69(14): 1879-1901.
162. Wassef M, Abdelhaleim M, AbdulRahman E, Ghaith D. The role of OmpK35, OmpK36 porins, and production of b-lactamases on imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates, Cairo, Egypt. *Microbial Drug Resistance*. 2015; 1-4.
163. Low YM, Yap SX, Jabar KA, Ponnampalavanar S, Karunakaran R, Velayuthan R, et al. The emergence of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia: correlation between microbiologic trends with host characteristics and clinical factors. *Antimicrob Res Infect Control* 2017; 6(5): 1-13.
164. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 470-482.
165. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis*. 2013; 13(9): 785-796
166. Rui Z, Dehua L, Hua N, Yue F, Yunmin X, Jianhua L, Xueshan X. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Yunnan Province, China. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2015; 471.
167. Labarca J, Poirel L, Ozdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbe New Infect*. 2014; 2: 50-51.
168. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ö ünç D, Özhak Baysan B, Çöplü N. Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey. *Mikrobiyol. Bul*. 2016; 50(1): 21-33
169. Doi Y, Paterson D.L. Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *Semin Respir Crit Care Med*. 2015; 36:74-84.
170. Fomda B.A, Khan A, Zahoor D. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing gram-negative bacilli: Emergence & clinical implications. *Indian J Med Res*. 2014; 140: 672-678.
171. Yong D, Toleman MA, Giske CG. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5046-5054.
172. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Türkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56: 2784-5.

173. Karaaslan A, Soysal A, Altinkanat Gelmez G, Kepenekli Kadayifci E, Söyletir G, Bakir M, Altinkanat Gelmez G, Kepenekli Kadayifci E, Söyletir G, Bakir M. Molecular characterization and risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacilli colonization in children: emergence of NDM producing *Acinetobacter baumannii* in a newborn intensive care unit in Turkey. *J Hosp Infect.* 2015; 92(1): 67–72.
174. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, Akin D, Yapislar H, Dilek AR, Sonmez E. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2015; 14: 44.
175. Poirel L, Heritier C, Tolun V et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48: 15–22.
176. Glasner C, Albiger B, Buist G et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: a survey among national experts from 39 countries. 2013. *Euro Surveill.* 2013; 18: 20575.
177. Poirel L, Carrer A, Eraksoy H, Cagatay A, Badur S, Nordmann P. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates producing OXA-48 in Turkey. In: 47th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2007; Poster no. C2-2063.
178. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56: 559–62.
179. Pano-Pardo JR, Ruiz-Carrascoso G, Navarro-San Francisco C, Gomez-Gil R, Mora-Rillo M, et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68: 89–96.
180. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 432–8.
181. Aktas Z, Kayacan C.B, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persist in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy.* 2008; 54, 2, 101-106.
182. Us E, Tekeli A, Arikan Akan O, Dolapci I, Sahin F, Karahan Z.C. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated between 2004-2007 in Ankara University Hospital, Turkey. *Mikrobiyol.Bul.* 2010; 44(1); 1-10.
183. Demir Y., Zerand Y., Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC , OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. *Pak. J. Pharm. Sci.* 2015; 28(3): 1127-1133.
184. Alp E, Perc D, Colakoglu S, Durmaz S, Kurkcu C.A, Ekincioglu C, Gunes T. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *Journal of Hospital Infection.* 2013; 84: 178-180.
185. Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. Carbapenemase-producing

*Enterobacteriaceae* and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? J Antimicrob Chemother. 2014; 69: 287-91.

186. Morrill J.H, Pogue J.M, Kaye S.K. Treatment Options for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections.2015. DOI: 10.1093/ofid/ofv050

187. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 413-31.

188. Pitout D. D , Nordmann P, Poirel L, Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a key pathogen set for global nosocomial dominance American Society for Microbiology. Antimicrob. Agents Chemother. 2015 doi:10.1128/AAC.01019-15

189. Ben-David D, Kordevani R, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. Clin Microbiol Infect. 2012; 18:54–60. [PubMed: 21722257]

190. Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology and laboratory detection. Clin Microbiol Newsl. 2009; 31: 55–62.

191. Duina D, Kayec K.S, Neuner E.A, Bonomoe R.A. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a review of treatment and outcomes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013 ; 75(2): 115–120.

192. Akova M, Daikos GL, Tzouvelekis L, Carmeli Y. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase producing Gram-negative bacteria. Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 439–448.

## 9. ÖZET

### B R ÜN VERS TE HASTANES NDE KARBAPENEM D RENÇL *KLEBS ELLA* *PNEUMON AE SU* LARINDA KARBAPENEM D RENÇ GENLER N N MOLEKÜLER ANAL Z VE SU LARIN KLONAL L K S

**Amaç:** *Klebsiella pneumoniae* önemli insan patojenlerinden biridir. Özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlarda saptanan su larında gözlenen karbapenem direnci tedavi alternatiflerini önemli düzeyde kısıtlamaktadır. *Klebsiella* türlerinde karbapenem direncinin gelişiminin önlenmesi ve dirençli su ların yayılımının azaltılması için uygulanacak önlemlerin geliştirilmesinde bu dirence neden olan moleküler dinamiklerin bilinmesi önem taşımaktadır. Bu çalışmada, klinik örneklerde saptanan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su larında daha önce tanımlanmış olan karbapenemaz genlerinin araştırılması ve izolatlar arasındaki klonal ilişkinin saptanması amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Kesitsel bir araştırma olarak planlanan bu çalışmaya hastanemiz tıbbi mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden Ocak 2012-Haziran 2014 tarihleri arasında soyutlanan karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su ları dahil edilmiştir. Prospektif olarak toplanan izolatların karbapenem direnci ertapenem disk yöntemi ve Modifiye Hodge testi çalışılmıştır; izolatların imipenem M K düzeyleri Etest yöntemi ile saptanmıştır. Su larda *OXA-48*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, *KPC* karbapenemaz genleri in-house PZR ile ve izolatlar arasındaki klonal ilişki Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) yöntemi ile araştırılmıştır.

**Bulgular:** Çalışma süresince 70 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* su u tanımlanmıştır. Yapılan moleküler analizde toplam 61 (%87.1) izolatta en az bir karbapenemaz geni saptanmıştır geri kalan 9 (%12.9) su ta ise çalışılan genlerden herhangi biri bulunamamıştır. Çalışma sonucunda su ların 51'inde (%72.8) *blaOXA-48*, 11'inde (%15.7) *blaNDM*, 3'ünde (%4.2) *blaVIM* bulunmuştur ve *blaOXA-48* üreten su lardan 4'ünde (%7.8) *blaNDM* gen birlikteliği olduğu gözlenmiştir. Çalışmaya dahil edilen su ların hiçbirinde *blaIMP* ve *blaKPC* saptanmamıştır. Yapılan Etest M K analizinde, çalışmaya alınan 70 izolatın 23'ünün (%32,8) imipenem M K düzeyi duyarlı sınırlar içinde (<4 µg/ml) bulunurken saptanan da ilim 0.125-32 µg/ml arasında olmuştur. Toplam 70 *K. pneumoniae* su undan 67'si 59 farklı PFGE profili göstermiş ve geri kalan 3 su ise anlamlı bir bant profili oluşturamamıştır. Klonal yönden ilişkili su lar, 4 farklı küme içerisinde yer almıştır ve su ların kümeleme oranı

%18 olarak saptanmı tır. En büyük küme be üyeli genotip 58 olup bunu sırayla 3 üyeli genotip 34 ve 2 üyeli genotip 29 takip etmi tır.

**Tartı ma ve Sonuç:** Bu çalı mada elde etti imiz sonuçlara göre, *OXA-48* ve *NDM* türü karbapenemazlar hastanemizdeki *Klebsiella* su larında görülen karbapenem direncinin çok büyük bir bölümünden sorumludur. Bu bulgular Ülkemizden daha önce bildirilen veriler ile oldukça benzerlik göstermektedir. Bu çalı ma tek bir merkezde yapılmı olmasına ra men su ların oldukça heterojen bir genotipik da ılım profili göstermesi, bu direnç genlerinin farklı kökenler arasında yayılım gösterdi inin en önemli bulgusu olmu tur.

**Anahtar Kelimeler:** *Klebsiella pneumoniae*, Karbapenemaz, *OXA-48*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, *KPC*, Moleküler epidemiyoloji.



## **Investigation of the Carbapenem Resistance Genes and the Clonal Relationships of the Carbapenem Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Strains in A University Hospital**

**Aim:** *Klebsiella pneumoniae* is among the leading human pathogens. The carbapenem resistance, particularly seen in the strains from the nosocomial infections, significantly limits the treatment options. Knowing the molecular dynamics of this resistance is important for development of the control measurements intended to prevent the emergence of carbapenem resistance in *Klebsiella* strains and to reduce the spreading of such resistant strains. In this study, previously determined carbapenemase genes and the clonal relationships of the carbapenem resistant *K. pneumoniae* strains isolated from clinical samples were aimed to be investigated.

**Material and Methods:** In this cross sectional study, the carbapenem resistant *K. pneumoniae* strains which were isolated from the clinical samples between January 2012 and June 2014 in the medical microbiology laboratory of our hospital were included. Strains were prospectively collected, the carbapenem resistance was determined with ertapenem disc and Modified Hodge test, and imipenem MICs of these strains were studied with Etest method. Carriage of the carbapenemase genes including *OXA-48*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, and *KPC* were determined with in-house PCR, and clonal relationships of the strains was studied with Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE).

**Results:** A total 70 carbapenem resistant *K. pneumoniae* were identified throughout the study. With the molecular analysis, at least one carbapenemase gene was determined in 61 (87.1%) strains, and there was no studied genes in any of the remaining 9 (12.9%) strains. After the analyses, *blaOXA-48* was found in 51 (72.8%) strains, *blaNDM* in 11 (15.7%) strains, and *blaVIM* in 3 (4.2%) strains; and it was observed that 4 (7.8%) strains harboring *blaOXA-48* were also carrying *blaNDM*. *blaIMP* and *blaKPC* were not determined any of the studied strains. With the Etest MIC analyses, imipenem MICs of 23 (32.8%) of the 70 studied strains were found under the susceptibility breakpoint (<4 µg/ml), and total MIC distribution of the included strains was between 0.125-32 µg/ml. A total 67 of 70 studied *K. pneumoniae* strains showed 59 different PFGE profile and remaining 3 strains didn't produce a meaningful band pattern. Clonally related strains were collected in 4 different cluster, and the clustering rate of all strains was found as 18%. The largest cluster was genotype 58 consisting 5 strains, followed by genotype 34 consisting 3 strains and genotype 29 including 2 strains.

**Discussion and Conclusion:** According to results of this study, *OXA-48* and *NDM* type carbapenemases were responsible for the majority of carbapenem resistance in the *Klebsiella* strains in our hospital. This data is very similar to the data previously reported from our country. Though this study was performed in a single center, the strains showing a highly heterogenic genetic distribution was a significant evidence of proving that these resistance genes spreading between different genetic clones.

**Key Words:** *Klebsiella pneumoniae*, Carbapenemase, *OXA-48*, *NDM*, *VIM*, *IMP*, *KPC*, Molecular epidemiology.

