

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE VE IRAK HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE
EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE İZOLATLARININ MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

**Hazırlayan
Aybike BAŞER**

**Danışman
Prof. Dr. Mikail AKBULUT
İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Pınar SAĞIROĞLU**

Yüksek Lisans Tezi

**Şubat 2021
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TÜRKİYE VE IRAK HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE
EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *Klebsiella Pneumoniae*
İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU
(Yüksek Lisans Tezi)**

**Hazırlayan
Aybike BAŞER**

**Danışman
Prof. Dr. Mikail AKBULUT
İkinci Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Pınar SAĞIROĞLU**

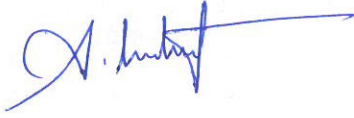
**Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi
tarafından FYL-2019-9270 kodlu proje ile desteklenmiştir.**

**Şubat 2021
KAYSERİ**

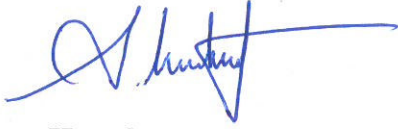
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

AYBIKE BAŞER



“Türkiye Ve Irak Hasta Örneklerinden İzole Edilen Karbapenem Dirençli *Klebsiella Pneumoniae* İzolatlarının Moleküler Karakterizasyonu” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.



Hazırlayan

Aybike BAŞER



Danışman

Prof. Dr. Mikail AKBULUT



Biyoloji ABD Başkanı

Prof. Dr. Abdurrahman AYVAZ

Prof. Dr. Mikail AKBULUT danışmanlığında Aybike BAŞER tarafından hazırlanan “Türkiye ve Irak hasta örneklerinden izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının moleküler karakterizasyonu” adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyoloji** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

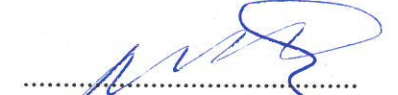
17/02/2021

JÜRİ:

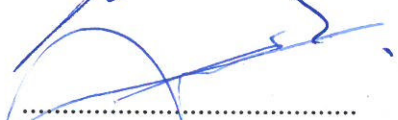
Danışman : Prof. Dr. Mikail AKBULUT



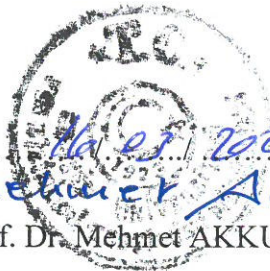
Üye : Prof. Dr. Mustafa Altay ATALAY



Üye : Prof. Dr. Fatih KÖKSAL

**ONAY:**

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun 16/07/2021 tarih ve 2021/16-16 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim ve tez çalışmam sürecinde kendi bilgi ve birikimi ile her konuda yardımcı olan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli danışman hocalarım Prof. Dr. MİKAİL AKBULUT ve Dr. Öğr. Üyesi PINAR SAĞIROĞLU' na, Her zaman destek ve yardımı için, değerli hocam Prof. Dr. MUSTAFA ALTAY ATALAY'a,

Her zaman sabırla, bana destek veren, hep yanımda olan sevgili arkadaşlarım Çağlanur KAMACI' ya Mohammed Hasan Nabeel ALMASHAT'a, Ahsen ÖNEN'e ve Emel ÇOLAK'a,

Yaşamımın her döneminde karşılaştığım tüm zorluklar karşısında yanımda duran ve bana inanan, sevgili babam Mehmet BULUT'a annem Sevgi BULUT'a kardeşlerim İkra BULUT'a ve Koray BULUT'a, yüksek lisans eğitimim süresince varlığı ile bana güç veren, desteğini esirgemeyen eşim EREN OKAN BAŞER'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Aybike BAŞER

ŞUBAT 2021, KAYSERİ

TÜRKİYE VE IRAK HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Aybike BAŞER

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü

Yüksek Lisans Tezi, Şubat 2021

Danışman: Prof. Dr. Mikail AKBULUT

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Pınar SAĞIROĞLU

ÖZET

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden elde edilen 50 *Klebsiella pneumoniae* izolatının moleküler karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Karbapenem direnci, meropenem mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Test edilen izolatların 50 tanesinde (25 Türkiye, 25 Irak), *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{IMP} karbapenem direnç genleri ve *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} genişlemiş spektrumlu direnç genleri spesifik primerler kullanılarak PCR yöntemi ile taranmıştır. Bu direnç genlerine ek olarak, OmpK35, OmpK36 porin genleri de PCR ile amplifiye edilmiş ve incelenmiştir. Amplikonlar dizilenmiş, pasteurre web sitesi ve uygun yazılımlar kullanılarak analiz edilmiştir. Beta-laktamaz genlerinin oranı, *bla*_{TEM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, *bla*_{GES} ve *bla*_{KPC} için sırasıyla 70, 50, 40, 34, 32 ve 4 olarak bulunmuştur. Çalışılan izolatlar arasında *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} β-laktamaz genleri saptanmamıştır. İzolatların tamamında OmpK35 ve OmpK36 porin genleri PCR ile çoğaltılmış ve beklenen boyutta ürün vermiştir. Bu izolatların antibiyotik direncinden sorumlu plazmitlerin sıklığını belirlemek için plazmit bazlı replikon tiplemesi yapılmıştır. Replikon tiplemesi için sadece 25 izolat çalışılmış ve incelenen tüm izolatlarda birden fazla tipte replikon tespit edilmiştir. İncelenen izolatlarda üçden dokuza kadar değişen sayıda çeşitli plazmid tipi tespit edilmiştir. İzolatların çoğunun aynı zamanda birden fazla tipte direnç genine sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, OmpK35 ve OmpK36 porin genlerinde çeşitli varyasyonlar tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, PCR, Plazmit Tiplendirmesi, Karbapenem Direnci

**MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CARBAPENEM RESISTANT
Klebsiella pneumoniae ISOLATES OBTAINED FROM PATIENT SAMPLES IN
TURKEY AND IRAQ**

Aybike BAŞER

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

MS.c. Thesis, February 2021

Supervisor: Prof. Dr. Mikail AKBULUT

Asist. Prof. Dr. Pınar SAĞIROĞLU

ABSTRACT

In this study Molecular characterization of 72 putative *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from various clinical specimens were carried out. MIC values of meropenem were determined by broth microdilution test to determine carbapenem resistance of those isolates. Of the tested isolates 50 of them further studied for presence of carbapenem resistance genes including *bla*_{OXA}, *bla*_{GES}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} and extended spectrum beta-lactamase genes including *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} by PCR. In addition to those resistance genes, OmpK35, OmpK36 porin genes were also studied. Amplicons were sequenced and analyzed by using pasteurre website and appropriate softwares. The ratio of β -lactamase genes was found to be 70, 50, 40, 34, 32, and 4, for *bla*_{TEM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV}, *bla*_{GES} and *bla*_{KPC} respectively. *bla*_{CTX-M}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} β -lactamase genes were not detected among the studied isolates. All isolates were found to be positive for OmpK35 and OmpK36 porin genes and expected size PCR product was obtained. Plasmid based replicon typing of those isolates were also carried out to determine the type of plasmids responsible from antibiotic resistance. Only 25 isolates were studied for replicon typing and more than one type of replicon was detected in all the studied isolates. Replicon types were ranging from three to nine among the studied isolates. Most of the Isolates were also carrying out more than one type of resistance genes. Also, several variations were detected in OmpK35 and OmpK36 porin genes.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, PCR, Plasmid Typing, Carbapenem Resistance.

İÇİNDEKİLER

TÜRKİYE VE IRAK HASTA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iii
ÖNSÖZ	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
KISALTMALAR.....	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiii
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	3
1.2. <i>Klebsiella spp</i>	4
1.2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	6
1.2.2. Morfoloji ve Biyokimyasal Özellikleri	6
1.2.3. <i>Klebsiella</i> 'nın patojenitesi.....	7
1.3. beta-Laktam Antibiyotikler.....	7
1.3.1. Penisilinler.....	8
1.3.2. Sefalosporinler	8
1.3.3. Monobaktamlar.....	9

1.3.4. Karbapenemler	9
1.3.5. β -Laktamaz İnhibitörleri	9
1.4 β -Laktamların Etkisine Karşı Gelişen Bakteriyel Direnç	9
1.5. β -Laktamazlar	10
1.5.1. β -Laktamazların Sınıflandırılması.....	10
1.6. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar.....	11
1.6.1. Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazların Sınıflandırılması	11
1.6.1.1. TEM β -Laktamazlar	11
1.6.1.2. SHV β -Laktamazlar	12
1.6.1.3. CTX-M β -Laktamazlar.....	12
1.6.1.4. OXA β -Laktamazlar	12
1.6.1.5. PER β -Laktamazlar	13
1.6.1.6. GES β -Laktamazlar	13
1.6.1.7. Diğer Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar	13
1.7. Karbapenemazlar	13
1.7.1. Sınıf A karbapenemazlar.....	14
1.7.2. Sınıf B Metallo-beta-laktamazlar	14
1.7.3. Sınıf D karbapenemazlar	15

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal.....	16
2.2. Yöntem.....	17
2.2.1. Örneklerin toplanması ve bakteriyel tanımlama	17
2.2.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi	17
2.2.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tesbiti İçin Antibiyotik Solüsyonunun Hazırlanması	17
2.2.4. Dilüsyon Testi için İnokulum Hazırlanması	19
2.2.5. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tesbiti İçin Plakların Hazırlanması	19
2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	20

2.2.7. PCR Reaksiyonunun Optimizasyonu	21
2.2.8. PCR Ürünlerinin Jel Elektrophorezi ve Amplikon Dizilenmesi	23
2.2.9. Plazmit Tiplendirmesi.....	23

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1 İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri	23
3.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları	28
3.3 Amplikonların Dizilenmesi Ve Dizilerin Veri analizi	32
3.4 Plazmid Tiplemeşi.....	37

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1. Tartışma	39
4.2. Sonuç ve Öneriler	43

KAYNAKÇA.....	45
---------------	----

ÖZGEÇMİŞ	55
----------------	----

KISALTMALAR

7-ASA: 7-amino-sefalosporinik asit

APA: Aminopenisilanik Asit

GES: Guyana Extended Spectrum Beta-Lactamase

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar

IMP: İnosine-monophosphate metallo-beta-lactamase

KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

MIK: Minimal İnhibitör Konsantrasyon

NDM: New Delhi metallo-beta-laktamaz

OMP: Dış mebran proteinleri

OXA: Oxacillin-hidroliyzing

PBP: Penisilin Bağlayan Proteinler

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SHV: Sulfhydryl Variable

VIM: Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. <i>Klebsiella</i> Taksonomisi	5
Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar ve kitler	16
Tablo 2.2. PCR amplifikasyonu için kullanılan primerler	20
Tablo 2.3. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı	21
Tablo 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ısı profili ve döngü sayısı	22
Tablo 3.1. Suşların MIC değerleri	24
Tablo 3.2. Bu çalışmada kullanılan <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili.....	29
Tablo 3.3. Bu çalışmada kullanılan Türkiye'den izole edilen <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili.....	30
Tablo 3.4. Bu çalışmada kullanılan Irak'tan izole edilen <i>Klebsiella pneumoniae</i> suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili.....	31
Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan izolatların sekans tipleri [82] ve antibiyotik direnç geni profili.....	32
Tablo 3.6. Plazmid bazlı replikon tipleri ve moleküler büyüklükleri.....	37
Tablo 3.7. İzolatların taşıdıkları plazmid tipleri.....	38

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1	Ortak β -laktam halkası ve penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar arasındaki yapısal benzerlikler. R1 yan zincirleri kırmızı R2 yan zincirleri mavi ile gösterilmiştir.....	8
Şekil 3.1	İzolatların örnek dağılımları.....	26
Şekil 3.2	Antibiyotik direnç profili (Bionumerics 8.0 versiyon).....	27
Şekil 3.3	UPGMA küme analizi (Bionumerics 8.0 version).....	35
Şekil 3.4	Porin genleri ile UPGMA küme analizi (Bionumerics 8.0 version).....	36

GİRİŞ

1940'lerden beri kullanılan antibiyotikler tıp tarihindeki en önemli keşiflerden biridir.

Bakteriyel hastalıkların tedavisinde, mortalite ve morbiditesindeki azalmada çok önemli rol oynarlar. Bu sebeple tıp sektöründe kullanılan antibiyotikler en sık reçete edilen ilaçlar arasında yer alır [1,2]. Son zamanlarda antibiyotik kullanımı ile orantılı olarak antibakteriyel direnç artışı gözlenmektedir. Artan antibakteriyel direnç, verilen sağlık hizmetlerinin yeterliliğini ve devamlılığını güçleştirmektedir [3]. *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık etken olan etiyolojik ajanlar içinde yer alan gram negatif bakterilerdir [4]. Pnömoni, sepsis, menenjit, üriner sistem enfeksiyonu, yara yeri enfeksiyonu, intestinal enfeksiyonlar, yumuşak doku enfeksiyonu gibi önemli enfeksiyonlara neden olmaktadır [5,6].

Karbapenem dirençli *Klebsiella* cinsi bakteriler, son yıllarda tüm dünyada giderek artan, hızla yayılan önemli bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde iyileştirme seçenekleri kısıtlı ve karbapenem direncinin önemli bir mortalite faktörü olması nedeniyle özellikle erken tanı ve yayılımın engellenmesi konusunda yapılan çalışmalar artarak devam etmektedir [7,8].

Karbapenem direnç mekanizmaları bölgeden bölgeye değişiklik göstermektedir. Bu mekanizmalar tedavi ve kontrol önlemlerinde temel farklılıklar oluşturmada da önleme çalışmalarına katkı sağlayabileceği düşünüldüğünden epidemiyolojik olarak belirlenmesi ve izlenmesi, önerilen yaklaşımlardandır. *bla_{KPC}* (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz), özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Yunanistan'da en önemli karbapenemazken, ülkemiz ve Orta Doğu ülkelerinde en sık rastlanan direnç mekanizması *bla_{OXA-48}* olarak belirlenmiştir. İlk kez 2008 yılında tanımlanan *bla_{NDM}* (Yeni Delhi metallo-beta-laktamaz) ise tüm dünyada ve ülkemizde artan sıklıkta bildirilen bir direnç mekanizması olarak gündeme gelmiştir [9].

Bu alışma, Erciyes Üniversitesi Merkez Laboratuvarı'na gönderilmiş kültürlerden izole edilen ve Iraktaki hastalardan 2017-2019 yılları arasında alınan otomatize sistem ile tanımlanmış *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının antibiyotik direnç genlerini PCR yöntemi ile saptamak, ampikonları dizileyerek ilgili genleri karakterize etmek, risk faktörlerini belirlemek, baskın direnç mekanizmalarını incelemek amacı ile yapılmıştır.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. *Enterobacteriaceae*

Enterobacteriaceae çok sayıda gram-negatif çomaklardan oluşan geniş bir bakteri ailesidir ve bu bakterilerin birçoğu toprakta, suda, bitkilerde, insan ve hayvan barsaklarında bulunur [10].

Gram-negatif boyanan, 2-3 µ boyunda 0,3-1 µ eninde, katalaz pozitif, oksidaz negatif, nitratı nitrite indirgeyen çomaklardır. Birçoğu hareketli olmakla birlikte, hareketsiz üyeler de bulunmaktadır. Fakültatif anaerop olup, sporsuzdurlar. Genel üretici besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. Hepsi glukozu fermente etmekte olup glukoz dışındaki birçok karbonhidratı da asit ve gaz oluşturarak fermente ederler. Aminoasitleri dekarboksilasyon yoluyla parçalarlar. Karbonhidrat metabolizmaları ve oluşan son ürünler laboratuvar tanımlamalarında önemlidir. DNA içeriklerinde guanin/sitozin oranı (G+C) %39-59'dur. Normal barsak mikrobiyotasının önemli bir kısmını oluşturmakla beraber diğer vücut bölgelerinde pek bulunmazlar. Bir kısmı önemli nozokomiyal enfeksiyonlara yol açar. Septisemi olgularının yaklaşık %50'sinden, üriner sistem enfeksiyonlarının %70'inden fazlasından ve barsak enfeksiyonlarının önemli bir kısmından sorumludurlar [10].

Enterobacteriaceae ailesinin türleri antijenik yapılarına, biyokimyasal özelliklerine, ribonükleik asit (RNA)'lerinin 16S ribosomal-RNA dizilimlerine, deoksiribonükleik asit (DNA)'lerinin hibridizasyonuna göre sınıflandırılmışlardır [11].

Enterik bakteriler gram negatif, sporsuz, boyutları 0,5-3 µm arası değişen basillerdir. Hareketli olanlarda peritriş kirpik mevcuttur. *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı cinslerinde belirgin bir kapsül veya slime tabakası mevcut iken bazı cinslerinde ise olmayabilir [10].

Enterobacteriaceae ailesi fakültatif anaeroptur. En uygun 35°-37°C de ve CO₂'siz ortamda ürerler. 18-24 saat sonra kolonileri görünür hale gelir [11].

Biyokimyasal özellikleri: Glukozu fermente ettiklerinden dolayı fermentatif

bakteriler olarak da isimlendirilen *Enterobacteriaceae* ailesi oksidaz negatif olup, nitratları nitritlere indirgerler fakat alginatı eritmezler [11].

Antijenik yapı: Somatik (O), kirpik (flagella) (H) ve kapsül (K) antijenleri serolojik tiplendirilmesinde kullanılan ana antijenlerdir. Ek olarak tüm enterik bakterilerin dış yüzeyinde bulunan *Enterobacteriaceae* Common Antijen (ECA) ortaktır [11-12].

Lipopolisakkarit yapısındaki O antijeni hücre dış duvarında yer alıp ısıya, alkole ve asitlere dayanıklıdır. Bazı bakterilerin kirpiklerinde bulunan flagellin isimli protein yapısındaki antijenlere H antijeni denir ve bu antijen hareketsiz bakterilerde bulunmaz. Kapsül antijenleri hücre duvar antijenlerini örterek aglütinasyonu engelleyebilir ve ısı ile fonksiyonu kaybedebilirler. Hareketsiz olan bakterilerde de bulunabilen önemli bir yüzey antijeni de fimbria antijenidir. Protein yapısında olup kanda aglütinasyon oluşturma ve eritrosit dışındaki diğer hücrelere yapışabilme özelliğine sahiptir [10].

1.2. *Klebsiella spp*

Klebsiella pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesidir ve bu ailenin genel özelliklerini taşır. 19.yüzyılın sonlarında Alman mikrobiyolog Edwin Klebs tarafından '*Klebsiella*' ismi verilmiştir [19].

Klebsiella pneumoniae, Carl Friedlander tarafından ilk kez 1882 yılında pnömoniden ölen bir hastanın akciğerinden izole edilmiş ve uzun yıllar 'Friedlander basili' olarak tanımlanmıştır [19].

Drancourt ve arkadaşları, 2001'de 16S rRNA sekans analizi ve bakteriyel RNA polimerazın β alt ünitesini kodlayan *rpoB* geninin analizi ile *Klebsiella* türlerinin taksonomik özellikleri belirlenmiştir [13]. *Klebsiella* türlerinin taksonomisi Tablo 1.1 de verilmiştir [20].

Tablo 1.1 *Klebsiella* Taksonomisi [20]

Alem	Bacteria
Şube	Proteobacteria
Sınıf	Gammaproteobacteria
Takım	<i>Enterobacterales</i>
Aile	<i>Enterobacteriaceae</i>
Cins	<i>Klebsiella</i>
	+ <i>Klebsiella africanensis</i>
	+ <i>Klebsiella grimontii</i>
	+ <i>Klebsiella kielensis</i>
	+ <i>Klebsiella quasivariicola</i>
	+ <i>Klebsiella steroids</i>
	+ <i>Klebsiella quasipneumoniae</i>
	+- <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>
	\- <i>Klebsiella quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>
	+ <i>Klebsiella michiganensis</i>
	+ <i>Klebsiella variicola</i>
	+ <i>Klebsiella senegalensis</i>
	+ <i>Klebsiella milletis</i>
	+ <i>Klebsiella</i> cf. <i>Planticola B43</i>
	+ <i>Klebsiella granulomatis</i>
	+ <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	+- <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>
	+- <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>
	\- <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaena</i>
	+ <i>Klebsiella oxytoca</i>
	\- <i>Klebsiella aerogenes</i>

Klebsiella türleri doğada, memeli canlıların gastrointestinal florasında yaygın olarak bulunurlar. Sağlıklı bireylerin derisinde, üst solunum yollarında ve kolonda kommensal olarak yer almaktadırlar. Hastane enfeksiyonlarına neden olma sıklığı giderek artmaktadır. Enfeksiyon sıklığında artışın nedeni; hastanede kalma süresi, antibiyotik kullanımında artış ve cerrahi sonrası bulaşlarla ilişkilendirilmiştir [14].

1.2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella türlerin temel özelliklerinden biri, rutin laboratuarlarda özel koşullar olmaksızın büyüme yeteneğidir. İdeal pH 7.2 ve büyüme sıcaklığı 35°C ila 37°C'dir.

Bu bakteriler eozin metilen blue (EMB) agar ve MacConkey agar gibi standart bir bakteriyolojik ortamda ürerler [21].

1.2.2. Morfoloji ve Biyokimyasal Özellikleri

Uçları yuvarlak, kısa, hareketsiz, kapsüllü ve sporsuz gram-negatif basillerdir. Tek tek veya ikiyeşerli biçimde bulunurlar. Bazı *Klebsiella* türlerinin polisakkarit yapıda kapsülleri vardır. Bu kapsül nedeniyle katı besiyerinde büyük ve mukoid koloniler oluşturabilmektedirler. Koloni morfolojileri; koklara benzer şekillerde, uzun filaman şeklinde (özellikle eski kültürlerde) vs. değişiklik gösterebilirler. Genel olarak iyi boyanırlar. Gram boyama yöntemiyle bazı türlerde bulunan kapsüller, hücre duvarı dışında boyanmamış (bazen de düzgün boyanmamış) şekilde görülür [15-16].

Klebsiella cinsi, biyokimyasal özelliklerine göre tanımlanmaktadır.

Biyokimyasal özellikleri;

- Simmons sitrat ve potasyum siyanid broth'da ürerler.
- Hidrojen sülfid (H₂S) oluşturmazlar.
- Metil red negatif, Voges Proskauer pozitifdir.
- Ornitin dekarboksilaz bulundurmaz ve ornitinden dekarboksilasyon yapamazlar [17].

Öncelikle glikoz olmak üzere mannitol, salisilin, adonitol, inozitol ve sorbitolden, çoğu zamanda laktoz ve sükrozdan gaz yapmak yoluyla şekerleri parçalarlar [18].

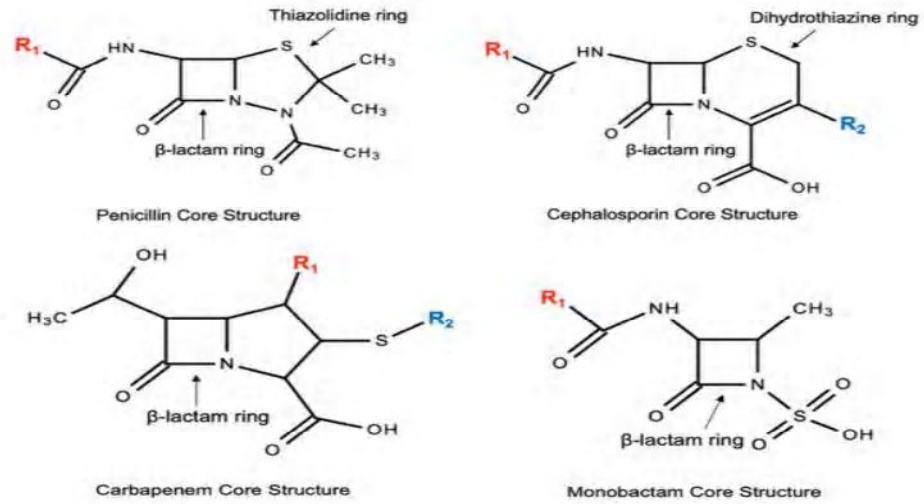
1.2.3. *Klebsiella*'nın patojenitesi

- Kapsül antijenleri; *Klebsiella* kompleks asidik polisakkaritlerden oluşan kapsüllere sahiptir. Bu kapsüller, dört ila altı şekerden oluşan ve negatif yüklü bileşen olarak üronik asitlerinde bol miktarda bulunduğu tekrarlayan alt birimleri ihtiva eder. *Klebsiella* türlerinde kapsüller, 77 serolojik tipte sınıflandırılabilir [22].
- Pili (Fimbria); enfeksiyon sürecinin ilk aşaması mikroorganizmanın konağın mukozal yüzeyine oldukça yaklaşarak tutunması gerekir. Bu tutunmayı, konakçı hücreye bağlanarak (aderens) yaparlar. Enterobacteriaceae 'deki yapışkan özellikler genellikle farklı pili türleri sayesinde gerçekleştirilir. Pili (fimbria), 10 µm boyunda 1-11 µm çapında bakteri yüzeyindeki ipliksi çıkıntılardır [22].
- Serum direnci; patojenik mikroorganizmalara karşı konağın ilk savunma sistemi, polimorfonükleer granüositler tarafından fagositoz yapmak ve serumun bakterisidal etkisini içerir [22].
- Sideroforlar; bakteri ihtiyaç duyduğu demiri sağlamak amacıyla, siderofor adı verilen, konak proteinlerine bağlı demiri alabilecek şelatlar oluştururlar [22].

1.3. β -Laktam Antibiyotikler

Dört üyeli bir siklik amid'den oluşan β -laktam halkası taşımalarından dolayı “ β -laktam” antibiyotikler olarak isimlendirilirler. β -laktam halkası birçok antibiyotik grubunun (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar) çekirdek yapısında yer almaktadır. Bu yapı β -laktam antibiyotiklerinin sınıflandırılmasında önem taşımaktadır [23].

β -laktam halkası, bir azot, üç karbon atomundan oluşan 4 üyeli doymuş bir halkadır [25]. β -laktam antibiyotiklerinin sınıflandırılmaları içerdikleri halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirler ile belirlenir (Şekil 1.1). Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta laktamaz inhibitörleri olarak 5 gruba ayrılırlar [26].



Şekil 1.1. Ortak β -laktam halkası ve penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar arasındaki yapısal benzerlikler. R1 yan zincirleri kırmızı R2 yan zincirleri mavi ile gösterilmiştir [24].

1.3.1 Penisilinler

Penisilinlerin kimyasal yapısı, bir tiazolidin halkası, bir β -laktam halkası ve bir yan zincirden oluşmaktadır. β -laktam ve tiazolidin halkasının oluşturduğu yapı 6-aminopenisilanik asit (APA) adını alır ve aslında tüm penisilinler 6. pozisyonundaki değişikliklerle (6-APA) birbirlerinden farklı hale gelirler.

Antibakteriyel etkiyi β -laktam halkası sağlar. Hücre duvarındaki peptid zincirleri arasında çapraz bağlar oluşturan transpeptidazlar, karboksipeptidazlar, endopeptidazlar olan penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak bakteri hücre duvar yapımının transpeptidasyon basamağını inhibe edip peptidoglikan çatının yapımını önlerler [26].

1.3.2 Sefalosporinler

Sefalosporinlerin temel yapısı bir β -laktam halkası ve buna bağlı altılı dihidrotiazin halkasından oluşur (Şekil 1.1). Bu temel çekirdek 7-amino-sefalosporinik asittir (7-ASA). Bu çekirdekte yapılan değişikliklerle çok sayıda sefalosporin türevi üretilmiştir [27]. Sefalosporinler yapıları ve etki mekanizmaları bakımından penisilinlere benzemekle birlikte penisilinlerin aksine penisilinazlara karşı daha fazla dirençlidir. Buna, 7-ASA çekirdeğindeki β -laktam halkasına, tiazolidin halkasının değil, altılı bir halka olan dihidrotiazin halkasının bağlanması neden olur [28, 29].

1.3.3 Monobaktamlar

Yapısında β -laktam halkasından başka yan zincir olmaması sebebiyle diğer β -laktamlardan ayrılırlar [30]. Bu β -laktamlar toprakta yaşayan farklı bakteriler tarafından üretilmekte ve çoğunluğu zayıf antibakteriyel etkinlik göstermektedir. Gram negatif bakterilere karşı güçlü etkileri vardır.

Gram pozitif bakterilere ve anaerobik bakterilere karşı etkinliği hiç yoktur, bu nedenle dar spektrumlu olarak adlandırılabilirler [31-32].

1.3.4 Karbapenemler

Karbapenemler tüm β -laktamlar içinde, birçok Gram negatif, Gram pozitif aerobik ve anaerobik bakterilerin dahil olduğu en geniş spektrumlu bakteri öldürücü etkiye sahiptirler [34].

Kimyasal yapısı penisilinin β -laktam halkasına benzemektedir. Farklı olarak bu yapıda 1.pozisyon'daki sülfür yerine karbon, beş üyeli halkasındaki 2. ve 3. Karbon atomları arasında doymamış bağlar yer almaktadır (Şekil 1.1). Karbapenemlerin pek çok β -laktamaza dayanıklılığı, yan zincirindeki farklı trans konfigürasyonundan oluşmaktadır. Bu yapı tüm karbapenemlerde ortaktır. Karbapenem çekirdeği β -laktam halkasıyla birleşmiş bir dihidrotirol halkası içerir [10-33]

1.3.5 β -Laktamaz İnhibitörleri

Klinik olarak yaygın kullanımda olan beta-laktamaz inhibitörleri; klavulanat, sulbaktam ve tazobaktamdır. Yapısında β -laktam halkası bulunur bu nedenle β -laktamlara çok benzerler. Bu üç β -laktamaz inhibitörünün tek başlarına etkileri güçlü olmadığı için β -laktam antibiyotikleri ile belirli oranlarda kombinasyon oluşturarak etkilerini göstermektedirler [35-36].

1.4 β -Laktamların Etkisine Karşı Gelişen Bakteriyel Direnç

Antibiyotiğin hedefe bağlanma bölgesinde oluşan değişiklikler: β -laktam antibiyotiklerin hedefi bakteri hücre duvarında bulunan ve PBP olarak isimlendirilen transpeptidaz enziminin aktif bölgesidir. Bakteriler bu proteinlerde mutasyonun meydana gelmesi, proteinin fazla sentezlenmesi, düşük ilgili (afinite) başka bir PBP sentezlenmesi ve hedef PBP' nin yapısındaki değişim gibi yollarla direnç geliştirebilmektedirler [36-37-38].

Atım pompaları (Efluks): Enerjiye (ATP) bağımlı bir mekanizma ile antibiyotiklerin bakteri tarafından hücre içinden hücre dışına pompalanmasıdır [38].

Dış mebran proteinlerinde (OMP) azalma: Gram-negatif bakterilerde β -laktam antibiyotikler dış membranı OMP adı verilen, porin proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçerek periplazmik aralığa ulaşırlar. Bakteri OMP'lerde eksilmeye neden olarak veya yapılarını değiştirerek antibiyotiğin içeri alınmasını engeller ve direnç geliştirir [39].

Enzim ile antibiyotiğin inaktive edilmesi: β -laktamlara karşı en sık karşılaşılan direnç β -laktamazlar ile olmaktadır. β -laktamazlar, β -laktam halkasındaki siklik amid bağlarını kırarak β -laktamların etkisini ortadan kaldırırlar [37].

1.5 β -Laktamazlar

β -laktamazlar, β -laktam halkası üzerine tesir ederek kovalent açıl ester oluşturan ve esterin hidrolizi sonucu β -laktam antibiyotiğini deaktif hale getiren enzimlerdir [37].

1.5.1 β -Laktamazların Sınıflandırılması

Sınıflamada iki önemli sistem vardır. Ambler'in moleküler sınıflaması ve Bush-Jacoby-Mederios'un fonksiyonel sınıflamasıdır. Ambler sınıflaması β -laktamazları aminoasit benzerliği ve protein benzerliklerine göre 4 sınıfa (A, B, C ve D) ayırırlar [40-41].

Sınıf A: Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, penisilinleri

hidroliz eden çoğunlukla plazmid kontrolünde olan β -laktamazlardır. β -laktamazlar içinde en yaygın olanları SHV-1 ve TEM-1'dir [40-41].

Sınıf B: β -laktamazlar çinko bağımlı metalloenzimlerdir ve sefamisinler ve karbapenemler dahil bütün β -laktam antibiyotikleri içeren geniş bir etki spektrumuna sahiptirler

Sınıf C: Bakteri Kromozomunda AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle

AmpC enzimler olarak da isimlendirilen enzimlerdir. Geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktiftirler (sefalosporinaz).

Sınıf D: β -laktamazlar genellikle gram negatif bakterilerde bulunurlar. Oksasilini hidrolize eden serin beta laktamazlardır [40-41-42].

1.6 Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL): penisilinler, ileri kuşak sefalosporinler ve aztreonam gibi birçok beta-laktam antibiyotiklerini hidroliz eden enzimlerdir [43].

GSBL'ler çoklu antibiyotiklere karşı direnç kazandıran plazmidler tarafından kodlanan enzimlerdir. GSBL kodlayan genler genellikle beraberinde diğer direnç genlerini taşıyan transpozonlar ve integronlar gibi genomun taşınabilir kısımlarını içeren elemanlar bulundurmaktadır. Bu bakterilerin, kotrimoksazol, aminoglikozidler ve florokinolonlar gibi diğer antibiyotiklere dirençli olmalarını açıklar. Geniş direnç sebebiyle mevcut tedavi seçeneği az kalmaktadır [44].

1.6.1 Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazların Sınıflandırılması

GSBL'ler geniş spektrumlu penislinaz benzeri enzimlerdir ve klasik olarak tanımlanan GSBL'lerin büyük çoğunluğu TEM ve SHV beta laktamazlarından köken alırlar [45].

1.6.1.1 TEM β -Laktamazlar

TEM-1, plazmid kökenli bilinen ve en eski enzim olan olarak bilinir. Ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporin direncine neden olurlar. Genellikle transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimlerdir: penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidroliz edip etki edebilirler. Ancak oksiimino-sefalosporinlere karşı afiniteleri yoktur [46].

TEM tipi β -laktamazlar hem kromozomal hem de plazmid aracılığıyla yayılım gösterebilmektedir [47]. Genellikle *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de bulunmakla beraber diğer Gram negatif bakteri türlerinde de artan aralıklarla rastlanmaktadır. TEM tipi GSBL'ler, *E. aerogenes*, *M. morganii*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri*, *A. baumannii* ve *Salmonella spp.* gibi diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde de görülmektedir. Ayrıca *Enterobacteriaceae* ailesinden olmayan diğer Gram negatiflerde TEM tipi beta laktamazlar gözlenmiştir [48].

1.6.1.2 SHV β -Laktamazlar

SHV-1 tipi β -laktamazların kimyasal yapısı amino asit dizilimindeki farklılıklara rağmen TEM-1 ile %68'lik benzerlik göstermektedir [49].

İlk olarak 1983'te GSBL SHV (sulfhydryl variable) enzimi, *Klebsiella ozaenae*'den izole edilmiştir [50].

SHV enzimlerinin çoğu üçüncü kuşak sefalosporinlerin yanı sıra monobaktam ve karbapenemlere dirençle ilişkilidirler [51].

Geniş spektrumlu SHV-1 β -laktamazlar *K. pneumoniae*'de baskın olarak görülür.

SHV β -laktamazların yüzden fazla allelik varyantı vardır. Genellikle *K. pneumoniae*'de kromozomal olarak, *E. coli*'de ise plazmitler aracılığıyla yayılım gösterirler [52].

1.6.1.3 CTX-M β -Laktamazlar

CTX-M-tipi β -laktamazlar, sefotaksim hidrolize eder ve şimdiye kadar karakterize edilmiş 220'den fazla farklı CTX-M-tipi enzim vardır. CTX-M β -laktamazlar Enterobacteriaceae içinde yaygın olarak bulunur ancak enterobacteriaceae dışındaki türlerde de CTX-M tipi genler yüksek oranda bulunurlar [53].

Enterobacteriaceae'nin klinik izolatlarında bulunan blaCTX-M genleri, bazı türlerde blaCTX-M genleri kromozomlara entegre olmasına rağmen, esas olarak konjugatif plazmidler tarafından taşınır [54-55].

1.6.1.4 OXA β -Laktamazlar

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 'dir. İlk olarak Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde bir hastanın kan kültüründen izole edilen *P. aeruginosa*'da gözlenmiştir [56].

OXA-tipi (oksasilin-hidrolize eden) enzimler büyük bir yayılıma sahip olup, *P. aeruginosa*'da çok görülmekle birlikte, *Enterobacteriaceae* üyelerinde de tanımlanmışlardır (57).

Bu tip genlerin yayılımı çoğunlukla plazmid, transpozon veya integron kontrolündedir [52-58].

1.6.1.5 PER β -Laktamazlar

PER-1 enzimi ilk defa Paris'te bir Türk hastanın idrarından izole edilen *P. aeruginosa*'dan tespit edilmiştir. Kromozomal kaynaklı olduğu yargısı öne sürülmüştür. Plazmid üzerinde kodlandığını 154 kb çiftinden daha büyük olduğu ve *P. aeruginosa* suşları arasında sağlıklı bir şekilde transfer edilebildiği gösterilmiştir [59].

1.6.1.6 GES β -Laktamazlar

GES (Guyana Extended Spectrum Beta-Lactamase): görülme sıklığı düşük olan GSBL'lerdendir. *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da saptanmıştır. GES-1 Tipi enzim ilk kez Fransa'da bir *K. pneumoniae* suşunda saptanmış ve bu enzimin plazmid ve integron tarafından kodlandığı bildirilmiştir [52].

GES -1 β - laktamazlar penisilinleri, dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri ve seftazidimi hidroliz ederler. Fakat aztreonam, sefamisin ve karbapenemleri hidroliz etme yetenekleri kısıtlıdır [60].

1.6.1.7 Diğer Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar

VEB-1 direnç geni PER-1 ve PER-2 ile benzer yapıya sahiptir. Seftazidim, sefotaksim ve aztreonama karşı güçlü direnç gösterirler. Klavunalik asitle inhibe edilirler. β -laktamaz dışı diğer antibiyotiklere karşı direnç geliştirilmesinden sorumlu tutulmuşlardır [61].

BES-1 (Brazilian Extended Spectrum Beta-Lactamase): BES-1 enzimi ilk olarak 1996 yılında Brezilya'da bir hastanede izole edilen *S. marcescens* suşlarında tespit edilmiştir.

BEL-1 (Belgium Extended Spectrum Beta-Lactamase): 2004 yılında Belçika'da bir *P. aeruginosa* suşlarında gözlenmiştir. GES-1, CXT-M ve BES-1 ile aminoasit benzer homolojiye sahiptir [52].

1.7. Karbapenemazlar

Birçok gram-negatif bakterinin, *Enterobacteriaceae* ailesinin bazı üyelerinin ve gram-pozitif bakterilerin enfekte ettiği hastaların tedavisinde kullanılan karbapenemlere karşı direnç görülmektedir. Karbapenem direnç mekanizmaları; beta-laktamaz üretimi, atım pompaları, porin ve PBP'lerin yapısı veya fonksiyonlarının değişimi gibi yollarla ortaya çıkmaktadır. Bazen bu mekanizmaların birden fazlası beraber görülebilirler [62].

Direnç mekanizmalarından “beta-laktamaz” ailesinin en geniş spektrumuna sahip olan tipi karbapenemazlardır. Bu enzimler, karbapenemlerden başka diğer beta-laktam antibiyotiklerindeki hidroliz eder ve hali hazırda bulunan beta-laktamaz inhibitörlerinden de etkilenmemektedirler [63].

Karbapenemazlar intrinsik (kromozomal) veya ekstrinsik (kazanılmış) olabilirler [64].

Kazanılmış (ekstrinsik) karbapenemazlar karbapenemlerin yanında diğer beta-laktam grubu antibiyotiklerde direnç gösterebilme yeteneğine sahiptirler. Ambler sınıf A, B ve D beta-laktamaz grubunda bulunurlar [65]. Sınıf A karbapenemazları “*Serratia marcescens* enzyme” (SME), “not metalloenzyme carbapenemase” (NMC), “imipenem-hydrolyzing beta-lactamase” (IMI), “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” (KPC) ve “Guyana Extended Spectrum Beta-Lactamase” (GES) enzimleri yer alır. Sınıf B karbapenemazları “inosine-monophosphate metallo-beta-lactamase” (IMP), “Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase” (VIM), “German imipenemase” (GIM), “Sao Paulo MBL” (SPM), “Seoul imipenemase” (SIM) ve “New Delhi metallo-beta-laktamaz” (NDM 1) enzimleri, sınıf D karbapenemazları ise oksasilinleri hidroliz eden “Oxacillin-hydrolyzing”(OXA) enzimleri yer alırlar [63].

1.7.1 Sınıf A karbapenemazlar

Karbapenemler, sefalosporinler, penisilin ve aztreonam olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotiklerine direnç gösterirler. Tazobaktam ve klavulanik asit ile inhibe olurlar [63].

“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase” KPC plazmidlerle yayılım gösterirler ve substrat hidroliz spektrumları aminothiazoloksime sefalosporinleri içermektedirler. KPC beta-laktamazlar özellikle *K. pneumoniae*’da sık görülmektedir [66-67].

GES enzimlerini kodlayan genler plazmidler üzerindeki integronlarda bulunmaktadır. Penisilin ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinler dahil yüksek hidroliz spektrumuna sahiptirler [68].

1.7.2 Sınıf B Metallo-beta-laktamazlar

Diğer beta-laktamazlar gruplarından farklı olarak MBL’lar aktif bölgelerinde çinko iyonu içeren enzimlerdir. Klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler fakat etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) gibi bir metal şelatörü ile inhibe edilirler. Bu enzimlerin en önemli özelliği monobaktamlar dışında

tüm beta-laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilme yeteneğine sahip olmalarıdır [63-65].

Aktarılabılır Metallo-beta-laktamazlardan IMP ilk defa Japonya’ da 1988 yılında *P. aeruginosa* suşunda tanımlanmasıyla konjugatif bir plazmidle taşınan MBL geni olarak tanımlanmıştır geniş spektrumlu sefalosporinlere dirençli olduğu bildirilmiştir [69-70].

VIM “Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase” kazanılan Metallo-beta-laktamaz’ların ikinci büyük grubunu oluşturan enzimlerdir. VIM 1 ilk 1997 yılında İtalya’da bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur. Bu izolat imipenem, piperasilin, seftazidim, meropenem ve aztreonam gibi beta-laktamlara karşı dirençli bulunmuştur. VIM 1 geni de IMP genlerinde olduğu gibi klas 1 integronlara gen kaseti olarak bütünleşmiştir [71].

NDM 1 “New Delhi metallo-beta-laktamaz” yeni tanımlanan bir Metallo-beta-laktamaz geni NDM 1’i taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları ilk olarak 2009 yılında *K. pneumoniae* tarafından enfekte edilmiş bir hastadan Hindistan’da tanımlanmıştır [72]. NDM 1 plazmidler tarafından kodlanır ve karbapenemlere %90’ın üzerinde direnç gösterebilir [73].

1.7.3 Sınıf D karbapenemazlar

OXA “Oxacillin-hydroliyzing” beta-laktamazlar en fazla plazmidle kodlanan beta-laktamaz gruplarından birini temsil etmektedirler.

K.pneumoniae suşlarında OXA-48 ilk olarak 2001 yılında Türkiye’de bir hastadan izole edilen bir suşta tespit edilmiş, daha sonra artan sıklıkla bildirimi söz konusudur.

Genel olarak klavulanik asit ve EDTA ile iyi inhibe olmazlar ve amino asit dizi yapı büyük oranda değişkendir [63].

OXA tipi karbapenemazların substrat spesifiklikleri geniştir. Penisilinleri (benzil penisilin, ampisilin, piperasilin, tikarsilin) ve dar spektrumlu sefalosporinleri (sefalotin ve sefaloridin) etkili bir şekilde direnç gösterirken, geniş spektrumlu beta-laktamazları (seftazidim, sefotaksim) ve aztreonamı çok az hidrolize eder ya da hiç hidrolize edemezler [74].

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Materyal

Bu çalışma boyunca çeşitli kimyasallar ve kitler kullanılmıştır (Tablo 2.1). Kitler, kimyasallar farklı kaynaklardan ve farklı üreticilerden satın alınmıştır.

Tablo 2.1. Kullanılan kimyasallar ve kitler

Kimyasalların ve kitlerin adı	Üretici firma	Kullanım amacı
DNA polimeraz	abm® Taq Kanada	PCR
5× master mix Ready to Load	FIREPol® Tartu, Estonya	PCR
6× DNA loading Dye Buffer Blue	SOLIS BIODYNE® Tartu, Estonya	Örnekleri jele yükleme
dNTP karışımı	BIOLINE® London, İngiltere	PCR
100bp DNA Ladder	Geneaid® Tayvan	dsDNA fragmentlerinin 100bp ile 1000bp arasında boyutlandırılması
Distile Su DNase/ RNase free	invitrogen® İngiltere	PCR reaksiyon
MgCl₂	Thermo fisher scientific® ABD	PCR reaksiyon
RedSafe	Abm Kanada	DNA fragmentlerinin tespiti
Meropenem	Sigma, ABD	Meropenem direnci
TRIS	MERCK® Almanya	TBE, TAE hazırlanması
Borik asit	SIGMA® ABD	TBE Tampon hazırlama
Asetik asit	SIGMA ALDRICH® Almanya	TAE Tampon hazırlama
Ethanol	SIGMA ALDRICH® Almanya	DNA çöktürme
Çikolata/ kanlı agar	BD BBL™ Stacker™ Almanya	<i>Klebsiella pneumonia</i> Üretmek için agar besiyeri
Primerler	Ankara/TÜRKİYE	Hedeflenen gen bölgesinin amplifikasyonu

10X TAE Tamponu

48,4 gr Tris (Hidroksimetil) ve 3,72 gr EDTA (Etilendiamin tetraasetik asit) damıtılmış su ile çözüldü. 11,4 ml asetik asit karışıma eklendi. Son hacim 1 litre olacak şekilde saf su eklendi. Stok TAE tamponu jelde kullanabilmek için 10 kez seyreltildi (1X TAE).

10X TBE Tamponu

108 tris, 55 gr borik asit ve 7,5 gr EDTA, 800 ml steril damıtılmış su içinde çözüldü. Çözelti 1 litreye tamamlandı ve pH 8.0 olarak ayarlandı. Tampon sterilize edildi. Kullanım için saf su ile 10 kez seyreltildi.

2.2. Yöntem

2.2.1. Örneklerin toplanması ve bakteriyel tanımlama

Bu çalışmaya Ağustos 2016'dan Eylül 2019'a kadar Bağdat, Irak ve Kayseri, Türkiye'deki çeşitli klinik örneklerden izole edilen 50 adet *K.pneumoniae* kökeni dahil edilmiştir. Vitek-2 (biomeriux, Fransa) otomatize sistemi ile karbapenemlerden biri veya birkaçına dirençli olarak tespit edilen izolatlar çalışmaya alınmıştır. İzole edilen kökenlerin tümü gliserol içeren boncuklu bakteri saklama tüplerinde (mikrobank) -80 °C'de saklanmıştır.

2.2.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Vitek-2 ile tanımlanan *K. pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile araştırıldı ve minimum antibiyotik inhibitör konsantrasyonları (MIC) belirlendi (75).

Bu araştırmada kullanılan klinik izolatları test etmek için karbapenem grubu antibiyotikler arasında yer alan meropenem kullanıldı ve ayrıca kolistin duyarlılığıda eş zamanlı olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışıldı.

2.2.3. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tesbiti İçin Antibiyotik Solüsyonunun Hazırlanması

İstenilen antibiyotik konsantrasyonuna ulaşmak için aşağıdaki formül kullanılarak hesaplama yapıldı;

- Meropenem çözeltisinin hazırlanması;

$$\text{Konsantrasyon} = 1280 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Potens} = 980 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Volüm} = ? \text{ ml}$$

$$\text{Ağırlık (mg)} = \frac{\text{volüm ml} \times \text{konsantrasyon} (\mu\text{g/mL})}{\text{potens}(\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volüm (ml)} = \frac{\text{ağırlık mg} \times \text{potens} (\mu\text{g/mg})}{\text{konsantrasyon}(\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volüm ml} = \frac{10 \times 980}{1280}$$

$$\text{Volüm ml} = 7.656 \text{ ml}$$

10 mg meropenem 7.6 mL distile su ile çözüldü. Stok çözelti çalışma süresine kadar -20°C ' de muhafaza edildi. İstenilen konsantrasyona ulaşmak için stok çözelti mueller hinton broth ile 10 kez seyreltili. 1 mL meropenem stok çözeltisi 9 mL mueller hinton broth ile seyreltilerek $128 \mu\text{g/ml}$ 'lik son konsantrasyona ulaşıldı.

- Kolistin çözeltisinin hazırlanması;

$$\text{Konsantrasyon} = 1280 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Potens} = 731,71 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{Volüm} = ? \text{ mL}$$

$$\text{Volüm (ml)} = \frac{\text{ağırlık mg} \times \text{potens} (\mu\text{g/mg})}{\text{konsantrasyon}(\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volüm ml} = \frac{10 \text{ mg} \times 731,71(\mu\text{g/mg})}{1280(\mu\text{g/mg})}$$

$$\text{Volüm ml} = 5,716 \text{ ml}$$

10 g kolistin 5,716 mL steril su ile çözüldü. Stok çözelti kullanılabildiği kadar -20°C 'de saklandı. 1280 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyona sahip olan kolistin çözeltisi mueller hinton broth ile 1:10 oranında seyreltilerek 128 $\mu\text{g/ml}$ 'lik kullanılabilir son konsantrasyona ulaşıldı.

2.2.4. Dilüsyon Testi için İnokulum Hazırlanması

Tüm isolatlar kanlı agarda 18-24 saat 35°C 'de inkübe edildi. Bakteri suşuna ait kolonilerden steril pamuk uçlu eküvyon ile bir miktar alınarak 2.5 ml steril serum fizyolojik içinde sulandırıldı. McFarland 0,5 değerine göre bakteri süspansiyonu hazırlandı (2×10^8 CFU/ ml).

2×10^6 CFU/ mL değerine ulaşabilmek için hazırlanan süspansiyondan 100 μl ve 9.900 μl (1:100) steril serum fizyolojik içinde sulandırıldı. Son olarak bu süspansiyondan 0.5 mL ve 4.5 mL Mueller Hinton broth ile 1:10 oranında seyreltilerek 2×10^5 CFU/ mL inokulumu hazırlandı.

2.2.5. Minimal İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Tesbiti İçin Plakların Hazırlanması

MİK testi için 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanıldı.

- 1- İlk sütun kuyucukları dışındaki tüm kuyucuklara 100 μL mueller hinton broth aktarıldı.
- 2- 100 μL meropenem stok çözeltisi (128 $\mu\text{g/ml}$) ilk ve ikinci kolondaki tüm kuyucuklara eklendi.
- 3- İkinci kolondan itibaren 11. kolona kadar dilüe edilerek her 100 μL sonraki kolona aktarıldı. 12 numaralı son kolon pozitif kontrol olarak kullanıldı.
- 4- Her kuyucuğa 100 μL inokulum süspansiyonu (2×10^5 CFU/ mL) eklendi.
- 5- Kuyucuklardaki meropenem konsantrasyonu aşağıdaki şekilde gösterildi.



2.2.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

DNA izolasyonu Wright ve arkadaşlarının kullandığı metoda göre gerçekleştirilmiştir [76].

β -laktamaz (*bla*-VIM, *bla*-IMP, *bla*-KPC, *bla*-OXA-48, *bla*-CTXM, *bla*-TEM, *bla*-GES, *bla*-NDM, *bla*-SHV) ve porin (OmpK35, OmpK36) gen bölgeleri PCR ile çoğaltılmıştır

Karbapenemaz direnç gen bölgelerinin amplifikasyonu, Tablo 2.3'te verilen reaksiyon karışımı hazırlanarak ve Tablo 2.4'te belirtilen ısı profilleri kullanılarak T100 Thermal Cycler (BIO-RAD) cihazında gerçekleştirildi. Kullanılan primerler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

Tablo 2.2. PZR amplifikasyonu için kullanılan primerler

Gen	Primer	Primer dizilimi (5'-3')	Bağlanma sıcaklığı
Karbapenemaz	OXA	F:TTGGTGGCATCGATTATCGG R:GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	58° C
Karbapenemaz	NDM	F:TGGCAGCACACTTCCTATC R:AGATTGCCGAGCGACTTG	50° C
Karbapenemaz	KPC	F:CTGTCTTGTCTCTCATGGCC R:CCTCGCTGTACTTGTCATCC	53° C
Karbapenemaz	VIM	F:AGTGGTGAGTATCCGACAG R:TCAATCTCCGCGAGAAG	49° C
Karbapenemaz	IMP	F:GTAAGTTTCAAGAGTGATGC R:GAAGGTGTTTATGTTTCATAC	46° C
Karbapenemaz	GES	F:TGCCATAGCAATAGGCGTAG R:GTTTTGCAATGTGCTCAACG	49° C
β -Laktamaz	SHV	F:TCAGCGAAAAACACCTTG R:TCCCGCAGATAAATCACC	46° C
β -Laktamaz	CTX-M-3	F:CGCTTTGCCATGTGCAGCACC R:GCTCAGTACGATCGAGCC	52° C
β -Laktamaz	TEM	F:CTTCCTGTTTTTGCTCACC R:AGCAATAAACCAGCCAGC	47° C
Porin geni	OmpK35	F:GGATGGAAAGATGCCTTCAG R:CATGACGAGGTTCCATTGTG	50° C
Porin geni	OmpK36	F:GGGAAGAATCGCACGAAATA R:TCTTACCAGGGCGACAAGAG	48° C

2.2.7. PZR Reaksiyonunun Optimizasyonu

PZR koşulları, her gen için tek ve spesifik bant elde etmek üzere, farklı $MgCl_2$ konsantrasyonları kullanılarak optimize edilmiştir. Ayrıca spesifik olmayan ve zayıf bant veren bazı primerlerin bağlanma (annealing) sıcaklığını optimize etmek için gradient PCR yapılmıştır.

Tablo 2.3. Polimeraz zincir reaksiyon karışımı

Materyal	Miktar
5×master mix ready to load (FIREPol®)	4µL
Primer-F	1µL (mol)
Primer-R	1µL
DNA	2µL
Distile su	12µL

Her reaksiyon için son hacim distile su eklenerek 20 µL' ye ayarlandı.

PCR ile tarama yapıldıktan sonra ampikon sentezlenmesi için aynı örneklerden 2 katı hacimde PCR karışımı hazırlandı ve dizileme için gönderildi.

Tablo 2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ısı profili ve döngü sayısı

Primer	Döngü Basamakları	Döngü Sayısı
OXA NDM KPC VIM	İlk Denatürasyon 94° C için 5 dakika	1
	Denatürasyon 94° C için 30 saniye Bağlanma 49-58 ° C için 30 saniye Uzama 72° C için 1 dakika	25
	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1
	İlk Denatürasyon 94° C için 45 saniye	1
CTX-M-3	Denatürasyon 94° C için 45 saniye Bağlanma 52° C için 45 saniye Uzama 72° C için 45 saniye	35
	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1
	İlk Denatürasyon 95° C için 2 dakika	1
	Denatürasyon 95° C için 30 saniye Bağlanma 49 ° C için 60 saniye İlk Uzama 72° C için 60 saniye Uzama 72° C için 5 dakika	35
GES	Uzama 72° C için 5 dakika	1
	İlk Denatürasyon 94° C için 30 saniye	1
	Denatürasyon 94° C için 30 saniye Bağlanma 46° C için 40 saniye Uzama 72° C için 50 saniye	36
	Son Uzama 72° C için 5 dakika	1
IMP	İlk Denatürasyon 94° C için 10 dakika	1
	Denatürasyon 94° C için 30 saniye Bağlanma 48-50° C için 30 saniye Uzama 72° C için 60 saniye	35
	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1
	İlk Denatürasyon 94° C için 10 dakika	1
OmpK35 OmpK36	Denatürasyon 94° C için 30 saniye Bağlanma 46-47° C için 1 dakika Uzama 72° C için 1 dakika	35
	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1
	İlk Denatürasyon 94° C için 10 dakika	1
	Denatürasyon 94° C için 30 saniye Bağlanma 46-47° C için 1 dakika Uzama 72° C için 1 dakika	35
TEM SHV	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1
	Son Uzama 72° C için 10 dakika	1

2.2.8. PCR Ürünlerinin Jel Elektrofözezi ve Amplikon Dizilenmesi

PCR ürünleri %2,5'luk agaroz jel kullanılarak elektrofözezi yapılmıştır. Jel elektrofözezi sonuçları Biorad ChemiDoc MP Jel dökümentasyon Sistemi, (Biorad, ABD) ile görüntülenmiştir

Tüm amplikonlar Illumina Miseq platform (Sugenomik Biyoteknoloji-Ankara) ile dizilenmiştir. Tüm direnç genlerinin ve porin genlerinin dizileri ikili hizalama ile sorgu dizisi ile veri tabanındaki referans dizilerin anlamlı bir uyuşma gösterdiğini belirlemek için Institute pasteur (https://bigsdb.pasteur.fr/cgi-bin/bigsdb/bigsdb.pl?db=pubmlst_klebsiella_seqdef&page=sequenceQuery) veri tabanında analiz edilmiştir. Ayrıca BIONUMERICS(version 8.0; applied maths, sint-martens-latam, Belgium) yazılım programı ile direnç genlerinin ve porin genlerinin dizileri kullanılarak UPGMA kümeleme analizi yapılmıştır.

2.2.9. Plazmit Tiplendirmesi

Örneklerin plazmit profilleri ve replikon tipi tesbiti PZR bazlı replikon tipleme kiti (PBRT 2.0 kit-DIATHEVA, İtalya) ile yapılmıştır.

DNA izolasyonu, kaynatma metodu ile gerçekleştirilmiştir. PZR karışımı; 23.8 µl PZR reaksiyon karışımı, 0.2 µl DNA polimeraz ve 1 µl DNA olacak şekilde hazırlanmıştır

Amplifikasyon koşulları;

Ön Denatürasyon: 95° C' de 10 dakika	} 1 döngü
Denatürasyon: 95° C' de 60 saniye	} 30 döngü
Bağlanma: 60° C' de 30 saniye	
Uzama: 72° C' de 60 saniye	
Son uzama: 72° C' de 5 dakika	} 1 döngü

Amplifikasyon sonrası Plazmit tiplerinin belirlenmesi için reaksiyon ürünü %2,5'luk agaroz jelde yürütülmüş ve Biorad ChemiDoc MP Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülenmiştir.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1 İzolatların Tanınması ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dâhil edilen tüm örnekler biyokimyasal özelliklerine göre ve otomatize BD Phoenix M50 sistemi kullanılarak tanınmıştır. *Klebsiella pneumoniae* olarak tanınan 50 izolat için antimikrobiyal duyarlılık testi yapılarak direnç düzeyleri tespit edilmiştir.

Türkiye ve Irak laboratuvarlarında tanınan *K. pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılıkları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir. Ayrıca Phoenix otomatize mikrobiyoloji sistemi ile antimikrobiyal duyarlılıkları doğrulanmıştır.

Otomatize sistemlerde izolatların imipenem, meropenem, ertapenem veya bu antibiyotiklerin birden fazlasına dirençli oldukları tespit edilmiştir. Ayrıca, belirtildiği gibi meropenem fenotipik direncini doğrulamak için mikrodilüsyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılık testi uygulanarak izolatların bu antibiyotiklere dirençlilikleri ve direnç seviyeleri belirlenmiştir (Tablo 3.1).

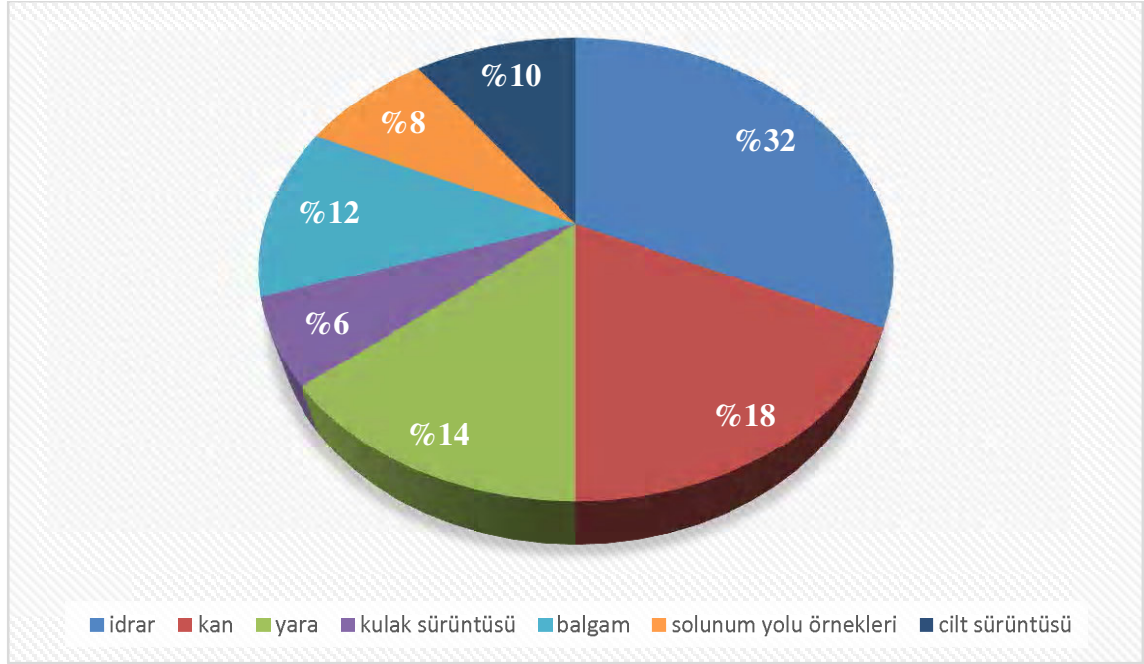
Fenotipik metodlarla karşılaştırıldığında özgüllüğü daha yüksek ve genotipik bir yöntem olan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile dirençli *K. pneumoniae* suşlarının karbapenem direnç genlerinin profilleri tespit edilmiştir. Çalışmaya 25'i Türkiyeden ve 25'i Iraktan olmak üzere toplam 50 örnek dahil edilmiştir. Örneklerin 42 tanesinin meropenem veya diğer karbapenemlere dirençli, 8 tanesinin ise meropeneme duyarlı oldukları tespit edilmiştir.

Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan suşların MIC değerleri

No	MIC meropenem	Phoenix meropenem	MIC Kolistin	Phoenix kolistin	Diğer karbapenemler	Kaynak	Ülke	İzolasyon yılı
1	32	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2018
2	>64	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	İDRAR	Türkiye	2018
3	32	>8	0,06	≤1	IMP 8 INTER	İDRAR	Türkiye	2018
4	>64	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2018
5	32	>8	0,125	≤1	IMP 8 INTER	İDRAR	Türkiye	2018
6	16	>8	0,06	≤1	ERT 8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2018
7	16	4	0,5	≤1	IMP 8 INTER	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2018
8	16	>8	0,06	≤1	IMP 8 INTER	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2018
9	16	>8	0,06	≤1	IMP 8 INTER	SOLUNUM SİSTEMİ	Türkiye	2018
11	4	4	16	>4	ERT >8 R	İDRAR	Türkiye	2018
12	16	>8	0,06	≤1	ERT >8 R	İDRAR	Türkiye	2018
13	>64	>8	16	>4	IMP >16 R	SOLUNUM SİSTEMİ	Türkiye	2018
14	32	>8	0,125	≤1	ERT >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2018
15	32	>8	32	>4	ERT >8 R	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2018
16	32	>8	0,06	≤1	IMP >16 R	SOLUNUM SİSTEMİ	Türkiye	2018
17	16	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2016
18	8	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	Irak	2016
19	0,06	≤0,125	64	≤1	IMP 0,5 S	BALGAM KÜLTÜRÜ	Irak	2016
20	32	2	0,06	>2	IMP 1	YARA	Irak	2016
21	4	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	İDRAR	Irak	2016
23	32	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	BALGAM KÜLTÜRÜ	Irak	2016
25	8	>8	0,06	≤1	IMP >8 R	BALGAM KÜLTÜRÜ	Irak	2016
26	4	>8	0,6	≤1	IMP >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Irak	2016
27	8	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	Irak	2016
29	4	>8	0,25	≤1	IMP >8 R	YARA	Irak	2016
30	32	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	KULAK SÜRÜNTÜSÜ	Irak	2016
31	8	>8	16	≤1	IMP >8 R	BALGAM KÜLTÜRÜ	Irak	2016
32	16	≤0,125	0,125	≤1	IMP ≤0,25 S	KAN KÜLTÜRÜ	Irak	2016
33	32	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	BALGAM KÜLTÜRÜ	Irak	2016
34	32	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	KAN KÜLTÜRÜ	Irak	2016
35	32	>8	0,25	≤1	IMP >8 R	YARA	Irak	2016
36	32	>8	0,125	≤1	IMP >8 R	YARA	Irak	2019

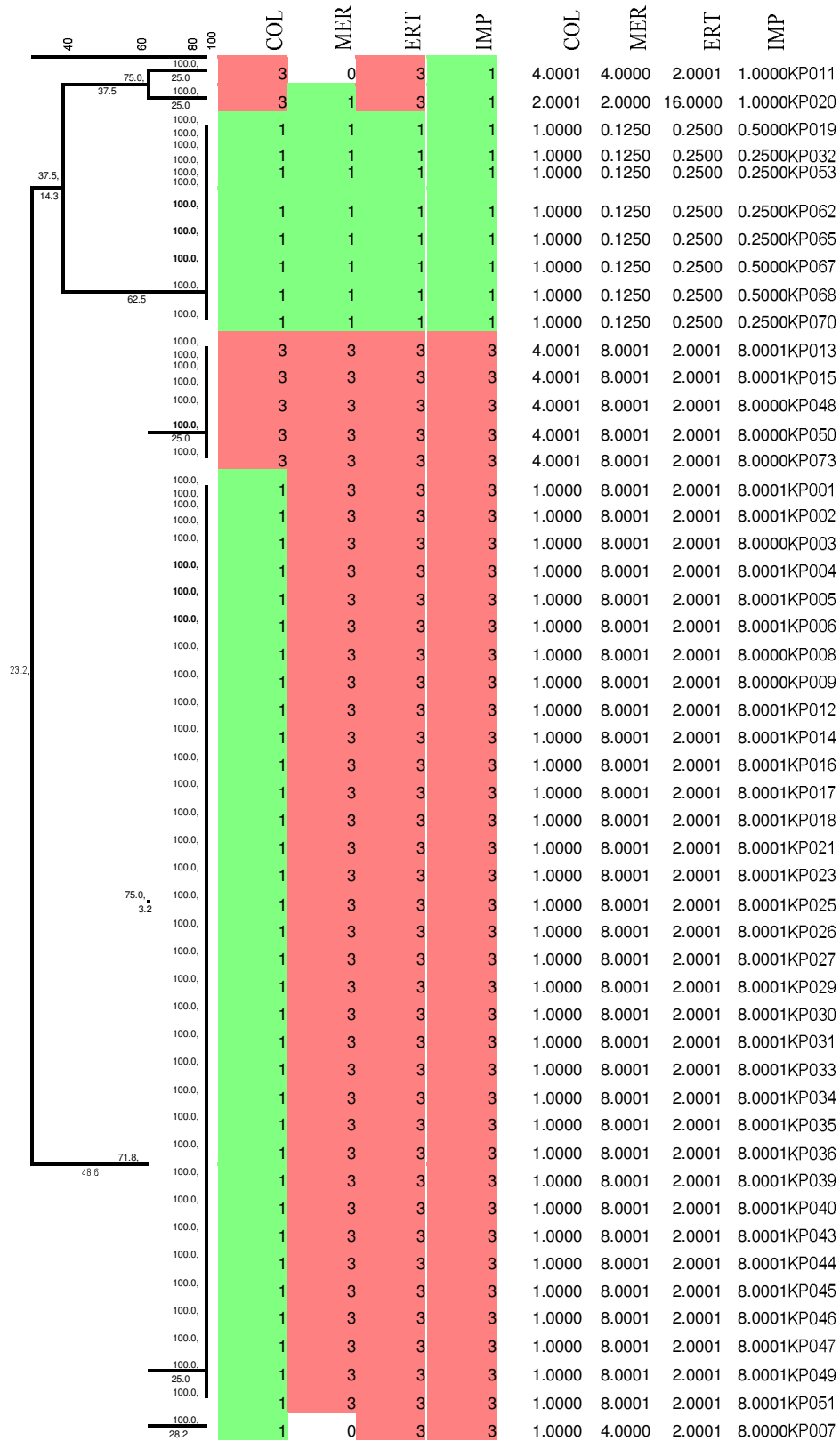
39	32	>8	0,125	<=1	IMP > 8 R	YARA	Irak	2019
40	32	>8	0,06	<=1	IMP > 8 R	İDRAR	Irak	2019
43	32	>8	0.5	<=1	ERT >8 R	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2019
44	32	>8	0.25	<=1	IMP 8 INTER	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2019
45	64	>8	0.125	<=1	ERT >8 R	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2019
46	32	>8	0.06	<=1	IMP R	SOLUNUM SİSTEMİ	Türkiye	2019
47	32	>8	0.06	<=1	IMP 8 INTER	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2019
48	16	>8	16	>4	IMP 8 INTER	YARA	Türkiye	2019
49	>64	>8	0.06	<=1	ERT >16 R	DERİ SÜRÜNTÜSÜ	Türkiye	2019
50	32	>8	2	>4	IMP 8 INTER	KAN KÜLTÜRÜ	Türkiye	2019
51	64	>8	0.125	<=1	IMP > 16 R	BALGAM	Türkiye	2019
53	16	<=0.125	1	<=1	IMP 2 I	İDRAR	Irak	2018
62	0.06	<=0.125	0.06	<=1	IMP <=1	İDRAR	Irak	2018
65	0.06	<=0.125	0.06	<=1	IMP <=0.25	KAN KÜLTÜRÜ	Irak	2018
67	0.06	<=0.125	0.06	<=1	ERT <=0.25	SOLUNUM SİSTEMİ	Irak	2018
68	0.06	<=0.125	0.06	<=1	ERT <=0.25	KAN KÜLTÜRÜ	Irak	2016
70	0.06	<=0.125	0.06	<=1	ERT <=0.25	BALGAM	Irak	2016
73	32	>8	32	>4	IMP 8 R	BALGAM	Türkiye	2016
	0.06		0.06		Negatif kontrol	E.coli ATCC® 25922™	Türkiye	
	8		4		Pozitif kontrol	K.pneumoniae ATCC® BAA-1705™	Türkiye	

K. pneumoniae çoğunluğu idrar örneklerinden (%32) izole edilmiştir. Bunları, %18 ile kan örnekleri ve %14 ile yara kültürü izlemiştir (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. İzolatların örnek dağılımları.

İzolatların MIC değerleri, otomatize sistem (Phoenix) ile bulunan duyarlılık değerleri ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) klinik sınır değerleri [81] kullanılarak BIONUMERICS veri tabanında antibiyotik direnç profili oluşturulmuştur. Kırmızı alan direnci (R) yeşil kısımlar duyarlılığı (S) göstermektedir. (Şekil 3.2)



Şekil 3.2. Antibiyotik direnç profili (Bionumerics 8.0 versiyon)

3.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 50 *Klebsiella pneumoniae* izolatının (%50'si Kayseri/Türkiye, %50'si Bağdat/Irak) tamamında OmpK35, OmpK36 genleri PCR ile çoğaltılmış ve beklenen boyutta bant üretmiştir. Çalışılan suşların 35'inde (%70) TEM geni, 25'inde (%50) NDM geni, 16'sında (%35) GES geni, 20' sinde (%40) OXA geni, 17'sinde (%34) SHV geni, 2'sinde (%4) KPC geni varlığı saptanmıştır.

VIM, IMP, CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PZR sonucu 50 *Klebsiella spp.* izolatının hiçbiri pozitif sonuç vermemiştir. PCR sonucu elde edilen veriler Tabl 3.2' de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Bu çalışmada kullanılan *Klebsiella pneumoniae* suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili

ID	Yıl	Şehir/Ülke	OXA	KPC	NDM	VIM	IMP	GES	SHV	TEM	CTX-M-3	OmpK35	OmpK36
1	2018	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+
2	2018	Kayseri/Türkiye	+		+			+		+		+	+
3	2018	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+
4	2018	Kayseri/Türkiye		+								+	+
5	2018	Kayseri/Türkiye			+			+		+		+	+
6	2018	Kayseri/Türkiye	+		+			+		+		+	+
7	2018	Kayseri/Türkiye	+						+			+	+
8	2018	Kayseri/Türkiye	+						+	+		+	+
9	2018	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+
11	2018	Kayseri/Türkiye						+	+			+	+
12	2018	Kayseri/Türkiye	+					+		+		+	+
13	2018	Kayseri/Türkiye		+					+			+	+
14	2018	Kayseri/Türkiye			+				+	+		+	+
15	2018	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+		+	+
16	2018	Kayseri/Türkiye			+			+	+	+		+	+
17	2016	Bağdat/İrak			+					+		+	+
18	2016	Bağdat/İrak			+			+		+		+	+
19	2016	Bağdat/İrak			+					+		+	+
20	2016	Bağdat/İrak			+				+	+		+	+
21	2016	Bağdat/İrak			+			+	+	+		+	+
23	2016	Bağdat/İrak			+							+	+
25	2016	Bağdat/İrak			+					+		+	+
26	2016	Bağdat/İrak			+							+	+
27	2016	Bağdat/İrak			+			+		+		+	+
29	2016	Bağdat/İrak										+	+
30	2016	Bağdat/İrak										+	+
31	2016	Bağdat/İrak										+	+
32	2016	Bağdat/İrak								+		+	+
33	2016	Bağdat/İrak								+		+	+
34	2016	Bağdat/İrak			+					+		+	+
35	2016	Bağdat/İrak			+					+		+	+
36	2016	Bağdat/İrak							+			+	+
39	2016	Bağdat/İrak			+							+	+
40	2016	Bağdat/İrak			+							+	+
43	2019	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+		+	+
44	2019	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+
45	2019	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+		+	+
46	2019	Kayseri/Türkiye	+						+	+		+	+
47	2019	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+
48	2019	Kayseri/Türkiye	+		+					+		+	+
49	2019	Kayseri/Türkiye	+		+					+		+	+
50	2019	Kayseri/Türkiye	+					+		+		+	+
51	2019	Kayseri/Türkiye	+		+			+		+		+	+
53	2019	Bağdat/İrak	+		+					+		+	+
62	2019	Bağdat/İrak							+			+	+
65	2019	Bağdat/İrak							+	+		+	+
67	2019	Bağdat/İrak			+				+	+		+	+
68	2019	Bağdat/İrak			+			+				+	+
70	2019	Bağdat/İrak			+			+	+			+	+
73	2019	Kayseri/Türkiye	+							+		+	+

VIM, IMP, CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucunda Türkiyeden elde edilen 25 *Klebsiella spp.* izolatının hiçbiri pozitif bulunmamıştır. Çalışılan 25 suşun 21' inde (%84) TEM geni, 19' unda (%76) OXA geni, 11' inde (%44) GES geni, 10'unda (%40) SHV geni, 8' inde (%32) NDM geni, 2' sinde (%8) KPC geni varlığı saptanmıştır (Tablo 3.3)

Tablo 3.3. Bu çalışmada kullanılan Türkiye'den izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili

ID	Yıl	Şehir/Ülke	OXA	KPC	NDM	GES	SHV	TEM	OmpK35	OmpK36
1	2018	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+
2	2018	Kayseri/Türkiye	+		+	+		+	+	+
3	2018	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+
4	2018	Kayseri/Türkiye		+					+	+
5	2018	Kayseri/Türkiye			+	+		+	+	+
6	2018	Kayseri/Türkiye	+		+	+		+	+	+
7	2018	Kayseri/Türkiye	+				+		+	+
8	2018	Kayseri/Türkiye	+				+	+	+	+
9	2018	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+
11	2018	Kayseri/Türkiye				+	+		+	+
12	2018	Kayseri/Türkiye	+			+		+	+	+
13	2018	Kayseri/Türkiye		+			+		+	+
14	2018	Kayseri/Türkiye			+		+	+	+	+
15	2018	Kayseri/Türkiye	+			+	+	+	+	+
16	2018	Kayseri/Türkiye			+	+	+	+	+	+
43	2019	Kayseri/Türkiye	+			+	+	+	+	+
44	2019	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+
45	2019	Kayseri/Türkiye	+			+	+	+	+	+
46	2019	Kayseri/Türkiye	+				+	+	+	+
47	2019	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+
48	2019	Kayseri/Türkiye	+		+			+	+	+
49	2019	Kayseri/Türkiye	+		+			+	+	+
50	2019	Kayseri/Türkiye	+			+		+	+	+
51	2019	Kayseri/Türkiye	+		+	+		+	+	+
73	2019	Kayseri/Türkiye	+					+	+	+

Irak'tan izole edilen 25 *Klebsiella pneumoniae* suşunun tamamında OmpK35, OmpK36 genleri PCR ile çoğaltılmış ve beklenen boyutta bant üretmiştir. KPC, VIM, IMP, CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 25 *Klebsiella spp.* izolatının hiçbirisi pozitif bulunmamıştır. Çalışılan 25 suşun 17'sinde (%68) NDM geni, 14'ünde (%56) TEM geni, 7'sinde (%28) SHV geni, 5'inde (%20) GES geni, 1'inde (%4) OXA geni varlığı saptanmıştır (Tablo 3.4)

Tablo 3.4. Bu çalışmada kullanılan Irak'tan izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarına ait genlerin PCR'a dayalı direnç genleri profili

ID	Yıl	Şehir/Ülke	OXA	NDM	GES	SHV	TEM	OmpK35	OmpK36
17	2016	Bağdat/İrak		+			+	+	+
18	2016	Bağdat/İrak		+	+		+	+	+
19	2016	Bağdat/İrak		+			+	+	+
20	2016	Bağdat/İrak		+		+	+	+	+
21	2016	Bağdat/İrak		+	+	+	+	+	+
23	2016	Bağdat/İrak		+				+	+
25	2016	Bağdat/İrak		+			+	+	+
26	2016	Bağdat/İrak		+				+	+
27	2016	Bağdat/İrak		+	+		+	+	+
29	2016	Bağdat/İrak						+	+
30	2016	Bağdat/İrak						+	+
31	2016	Bağdat/İrak						+	+
32	2016	Bağdat/İrak					+	+	+
33	2016	Bağdat/İrak					+	+	+
34	2016	Bağdat/İrak		+			+	+	+
35	2016	Bağdat/İrak		+			+	+	+
36	2016	Bağdat/İrak				+		+	+
39	2016	Bağdat/İrak		+				+	+
40	2016	Bağdat/İrak		+				+	+
53	2019	Bağdat/İrak	+	+			+	+	+
62	2019	Bağdat/İrak				+		+	+
65	2019	Bağdat/İrak				+	+	+	+
67	2019	Bağdat/İrak		+		+	+	+	+
68	2019	Bağdat/İrak		+	+			+	+
70	2019	Bağdat/İrak		+	+	+		+	+

3.3. Amplikonların Dizilenmesi ve Dizilerin Veri analizi

PCR amplifikasyon ürünleri, yeni nesil dizileme metodu ile İllumina/Miseq teknolojisi ile dizilenmiştir. Amplikonların fastA dosyalarının veri analizi Institut Pasteur web sitesinde gerçekleştirilmiştir. Institut Pasteur veri tabanında referans dizilerle karşılaştırılması sonucu beta-laktamaz genleri tanımlanmıştır.

Tablo 3.5. Çalışmada kullanılan izolatların sekans tipleri [82] ve antibiyotik direnç geni profili

ID	Sekans tipi	OXA	KPC	NDM	VIM	IMP	GES	SHV	TEM	CTX-M-3	OmpK35	OmpK36
1	15	OXA-48							TEM-1		+	+
2	15	OXA-48		NDM-2			GES-20		TEM-1		+	+
3	2096	OXA-232							TEM-171		+	+
4	307		KPC-2								+	+
5	15			NDM-1			GES-20		TEM-1		+	+
6	15	OXA-48		NDM-1			GES-20		TEM-1		+	+
7	15	OXA-48						SHV-244			+	+
8	\?	OXA-48						SHV-167	TEM-145		+	+
9	377	OXA-48							TEM-1		+	+
11	15						GES-20	SHV-244			+	+
12	15	OXA-48					GES-20		TEM-1		+	+
13	307		KPC-2					SHV-244			+	+
14	16			NDM-5				SHV-244	TEM-1		+	+
15	15	OXA-48					GES-20	SHV-244	TEM-1		+	+
16	15			NDM-1			GES-20	SHV-244	TEM-1		+	+
17				NDM-1					TEM-1		+	+
18	15			NDM-1			GES-20		TEM-1		+	+
19	530			NDM-1					TEM-183		+	+
20				NDM-1				SHV-60	TEM-1		+	+
21	15			NDM-1			GES-20	SHV-244	TEM-1		+	+
23	307			NDM-1							+	+
25	147			NDM-1					TEM-1		+	+
26				NDM-1							+	+
27	15			NDM-1			GES-20		TEM-1		+	+
29	37										+	+
30	2943										+	+
31	15										+	+
32	15								TEM-1		+	+
33	15								TEM-1		+	+
34				NDM-1					TEM-1		+	+
35				NDM-1					TEM-1		+	+
36	2943							SHV-253			+	+
39	15			NDM-1							+	+
40	15			NDM-1							+	+

43	15	OXA-48					GES-20	SHV-244	TEM-1		+	+
44	15	OXA-48							TEM-1		+	+
45	15	OXA-48					GES-20	SHV-244	TEM-1		+	+
46	15	OXA-48						SHV-244	TEM-1		+	+
47	101	OXA-48							TEM-1		+	+
48	101	OXA-48		NDM-1					TEM-1		+	+
49	16	OXA-48		NDM-5					TEM-1		+	+
50	15	OXA-48					GES-20		TEM-1		+	+
51	15	OXA-48		NDM-1			GES-20		TEM-1		+	+
53	469	OXA-48		NDM-1					TEM-1		+	+
62	4634							SHV-89			+	+
65	?							SHV-244	TEM-1		+	+
67	14			NDM-1				SHV-244	TEM-1		+	+
68	15			NDM-1			GES-20				+	+
70	15			NDM-1			GES-20	SHV-244			+	+
73	15	OXA-48							TEM-1		+	+

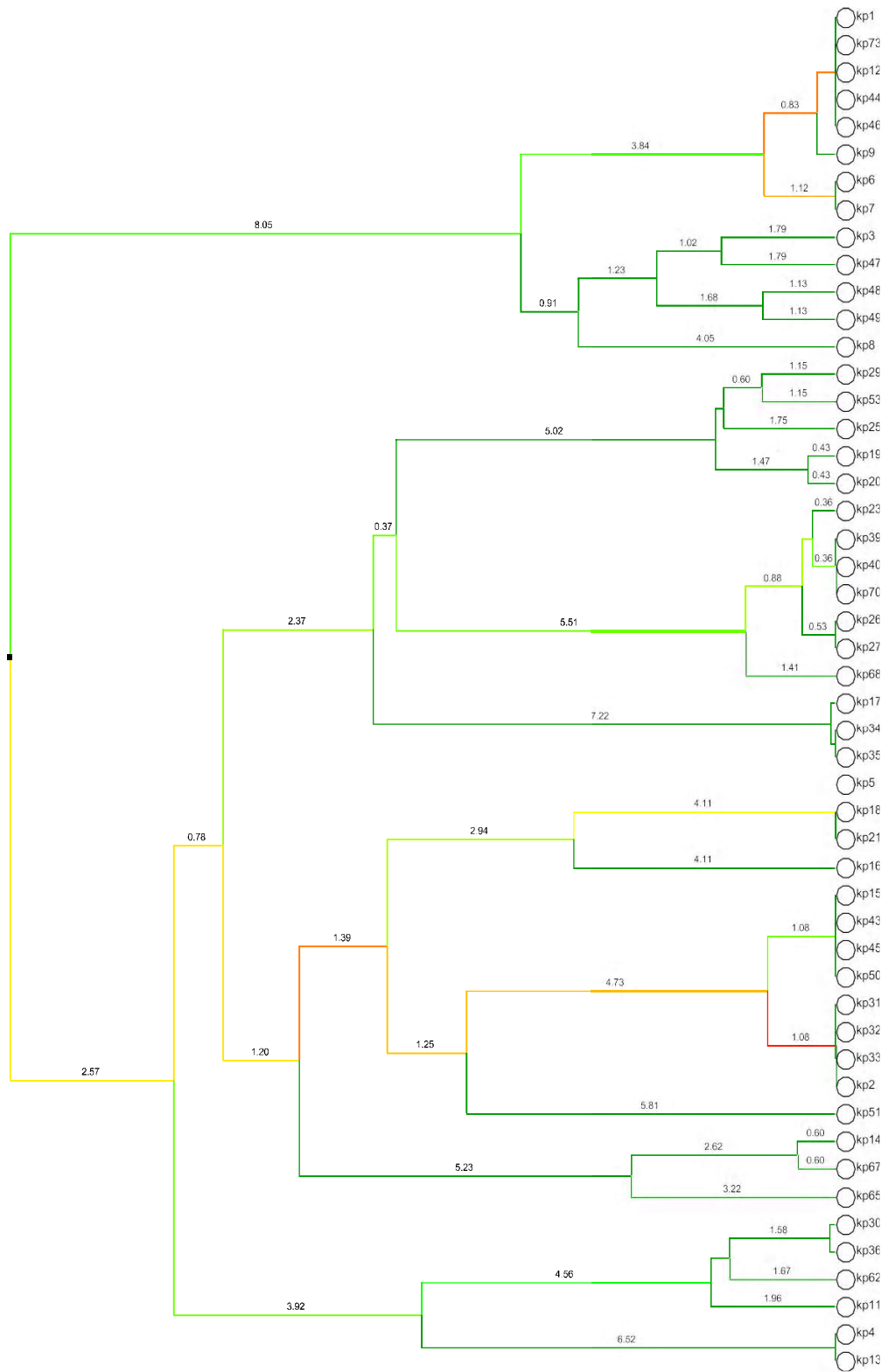
Bu çalışmada kullanılan *Klebsiella pneumoniae* suşlarının daha önce bir tez kapsamında yapılan MLST çalışmasında, Institute Pasteur veri tabanında 7 housekeeping geninin dizileri referans dizilerle karşılaştırılarak izolatların sekans tipleri belirlenmiştir [82]. Çalışılan izolatların 26'sının ST15 dizi tipine sahip olduğu belirlenmiştir. Bu 26 izolatın 16'sı Türkiye 10 tanesi Irak örnekleridir. Ayrıca 7 izolatın (8,17,20,26,34,35,65) allelik kombinasyonları ve Sekans tipi belirlenmemiştir [82].

- OXA pozitif 20 izolatın 19 tanesi OXA-48 türü olarak belirlenmiştir. Bunların 18 tanesi Türkiye ve 1 tanesi Irak örneklerine aittir. Türkiye'deki hastalardan izole edilen tek izolatın ise OXA-232 içerdiği belirlenmiştir.
- Türkiye izolatlarından olan 4 ve 13 numaralı örneklerin KPC pozitif oldukları saptanmıştır. Bu örneklerin ikisinde KPC-2 genine sahip olup bunların daha önce aynı sekans tipine (ST 307) sahip oldukları bir tez çalışmasında belirlenmiştir [82].
- 25 izolatta bulunan NDM geninin 22 tanesi NDM-1 beta-laktamaz olduğu belirlenmiştir. Bunlardan 17 tanesi Irak örneklerine 5 tanesi ise Türkiye örneklerine aittir. Farklı sekans tiplerinde NDM-1 geni mevcut iken Türkiye'ye ait iki örnekte tespit edilen NDM-5 geni ST16 tipine sahip bakterilerde görülmüştür. NDM-2 Türkiye'ye ait tek bir izolatta tespit edilmiştir.

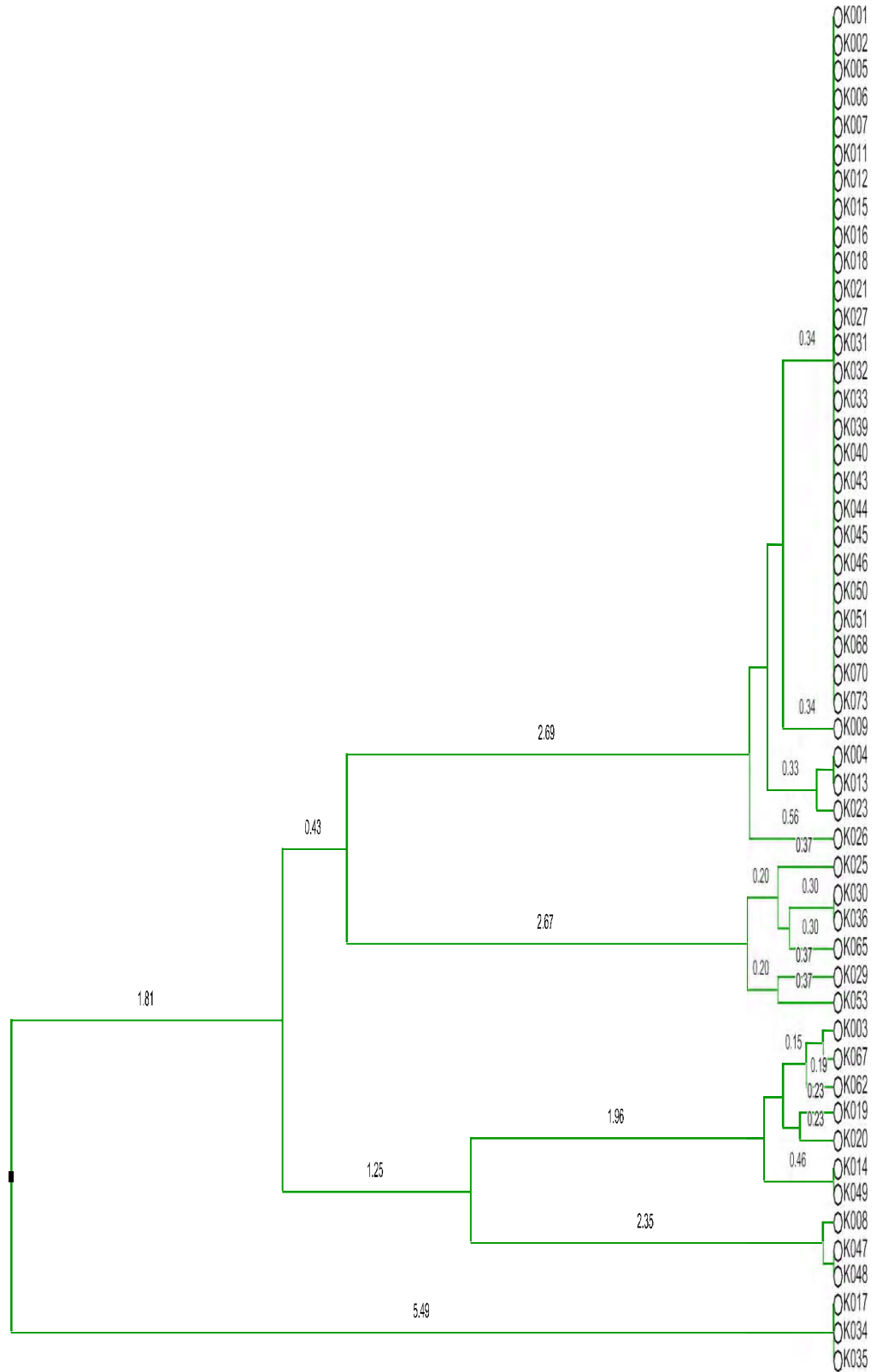
- ST15 sekans tipine sahip 16 örnekte görülen GES geninin tamamı GES-20 olarak karakterize edilmiştir. Bunların 11 tanesi Türkiye ve 5 tanesi Irak izolatlarındandır.
- SHV-244 geni toplamda 13 örnekte tespit edilmiştir (9 Türkiye ve 4 Irak). Diğer 4 izolat farklı sekans tiplerine ve farklı SHV türlerine sahiptir (SHV-167, SHV-60, SHV-253, SHV-89).
- En yüksek frekansta saptanmış olan TEM beta laktamaz geninin 32 tanesi TEM-1 olarak belirlenmiştir. (19 Türkiye ve 13 Irak). Diğer 2 tanesi TEM-171, TEM-145 taşımakta olup Türkiye izolatlarındandır. TEM-183 geni saptanan tek örnek Irak izolatıdır.
- Porin genlerinin dizi analizi ile elde edilen verilere göre OmpK35 ve OmpK36 genlerinin varlığı tüm izolatlarda tespit edilmiştir. Ancak tüm OmpK36 dizilerinde stop kodonları olduğu görülmüştür.

İzolatlar arasındaki genetik ilişkiyi ve gen alışverişini tespit etmek için tüm direnç genlerinin dahil edildiği bir dendrogram yapılmıştır (Şekil 3.3). En üst dalda bulunan Türkiye izolatlarından (1, 73, 12, 44, 46) olup, aynı sekans tipine (ST15) sahip oldukları daha önce yapılan bir tez çalışmasında belirlenmiştir [82]. Ayrıca bu izolatlar ortak olarak OXA ve TEM genlerine sahiptir. Bu gruba en uzak en alttaki dalda ise yine Türkiye izolatlarından olan 4 ve 13 numaralı örnekler KPC genine sahip olup, aynı sekans tipine (ST307) sahip oldukları daha önce yapılan bir tez çalışmasında belirlenmiştir [82]. Aynı grupta yer alan Irak izolatlarından 39, 40 ve 70 numaralı örnekler ortak NDM geni taşırlar ve aynı sekans tipine (ST15) sahip oldukları daha önce yapılan bir tez çalışmasında belirlenmiştir [82].

OmpK35 ve OmpK36 porin genlerinin dizileri kullanılarak yapılan analizin (Şekil 3.4) ilk hattında yer alan 26 adet izolat (1, 2, 5, 6, 7, 11, 12, 15, 16, 18, 21, 27, 31, 32, 33, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 50, 51, 68, 70, 73) başka bir tez çalışmasında aynı sekans tipine (ST15) sahip olduğu ve housekeeping genleri ile yapılan filogenetik ağaçta bu izolatların yine aynı dal üzerinde yer aldığı belirlenmiştir. Bu 26 izolatın 16' sı Türkiye 10 tanesi Irak örnekleridir [82].



Şekil 3.3. Direnç genleri ile UPGMA küme analizi (Bionumerics 8.0 version-topscore UPGMA tree)



Şekil 3.4. Porin genleri ile UPGMA küme analizi (Bionumerics 8.0 version)

3.4. Plazmid Tiplemesi

Çalışma için seçilen 25 *Klebsiella pneumoniae* suşunun antimikrobiyal dirençten sorumlu plazmidlerinin dağılımını ve sıklığını araştırmak için Plazmid bazlı replikon tipleme (PBRT 2.0 kit-Diatheva, İtalya) kiti kullanılmıştır. Plazmid Bazlı Replikon Tiplemesi ve ampikon büyüklükleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (Tablo3.4).

Tablo 3.6. İzolatların plazmid bazlı replikon tipleri ve moleküler büyüklükleri

Replikon	Inc grup	Referans plazmid	Amplikon (bp)
HI2	IncHI2	<i>Serratia marcescens</i>	298-308
M	IncM	<i>Citrobacter freundii</i>	741
I2	IncI2	<i>Escherichia coli</i>	316
FIB	IncF	<i>Escherichia coli</i>	683
L	IncL	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pOXA-48	854
X3	IncX3	<i>K.pneumoniae</i> pIncX-SHV	284
I1γ	IncI1γ	<i>S.enterica typhimurium</i> R621a	161
A/C	Inc A/C	<i>Aeromonas hydrophila</i>	418
R	belirsiz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Pk245	248
FIIk	IncFIIk	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKPN3	142-148
FIB KN	IncFIIk	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKPN-IT	631
FIB KQ	IncFIIk	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pKpQIL-IT	258
HIB-M	belirsiz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pNDM-MAR	570
FIB-M	belirsiz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pNDM-MAR	440

Çalışılan 14 replikonun tamamı *Klebsiella spp.* suşlarında tesbit edilmiştir. 25 *Klebsiella Pneumoniae* izolatlarının tümünde birden fazla plazmid replikonu tespit edilmiştir. Örneklerin en az 3 plazmid en fazla 9 ayrı plazmid taşıdıkları görülmüştür. PBRT testi ile 25 suştan 24'ünün I1 γ (IncI1 γ) taşıdıkları, 20'sinin FIIk (IncFIIk), 18'inin A/C (Inc A/C) ve en az HI2(IncHI2) plazmidlerini taşıdıkları belirlenmiştir.

Tablo 3.7. İzolatların taşıdıkları plazmid tipleri

ID	HI2	M	I2	FIB	L	X3	I1 γ	A/C	R	FIIk	FIB KN	FIB KQ	HIB-M	FIB-M
1					+		+	+	+					
2					+		+	+	+	+		+		
3					+		+			+	+		+	+
4				+	+		+	+		+	+	+		
6		+					+	+	+					
8		+		+	+		+		+					
13				+	+		+	+		+	+	+		
15		+		+	+		+	+	+					
17	+				+		+	+		+	+			
19					+		+	+		+				
23				+	+		+	+		+	+	+	+	+
26				+	+		+	+		+	+		+	+
29				+	+		+		+	+			+	+
30					+		+			+				
31				+	+		+	+	+	+	+	+		
33			+			+	+	+		+		+		
34	+						+	+		+	+			
35	+						+	+		+	+			
36			+			+	+			+				
43					+		+	+		+	+		+	+
45							+	+		+	+		+	+
48		+		+			+	+	+	+				
49						+		+		+	+			
51		+				+	+			+	+			
53				+			+				+			

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1.Tartışma

Karbapenemler, çoklu ilaca dirençli Gram negatif bakterilerin etkilerine karşı kullanılan son seçenek beta-laktam antibiyotiklerdir. Fakat 1980’li yıllardan sonra dünyada hızla yayılan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimleri nedeniyle karbapenemlerin kullanım miktarı çok fazla artmıştır. 1990’lı yılların başından itibaren plazmid kaynaklı karbapenem hidrolize eden enzimler tanımlanmaya başlanmıştır [91-92].

Ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmalarda en çok saptanan direnç geninin OXA olduğu ortaya konmuştur ve bununla birlikte NDM geni artışı dikkat çekici bulunmuştur [93]. Gram-negatif bakterilerdeki karbapenem direnci, beta-laktamaz üretiminin, eflüks pompalarının ekspresyonunun, porin kaybının ve PBP’lerde değişikliklerin sonucu olabilir. Karbapenem benzeri bileşiklerde dâhil olmak üzere beta-laktamlar, çeşitli bakteri ve mantarların doğal ürünleri olduğundan, hayatta kalmak için kendi iç beta-laktamazlarını üretmeye başladıkları varsayılmaktadır [63-85]. Direncin bu evriminden bir sonraki adım, karbapenemaz kodlayan genlerin mobil genetik elemanlara (plazmidler, transpozonlar) kaçmasıydı ve bu da direnç genlerinin farklı cinsler arasında bile başarılı bir şekilde yayılma olasılığını sağlamıştır [86].

Kahraman ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada RT-PCR yöntemi ile 100 *K.pneumoniae* izolatının 45’inde blaOXA-48 benzeri gen bölgesi pozitif saptanmış, OXA-48 varyantlarını belirlemek için pozitif bulunan 45 izolat HRMA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Sonrasında dizi analizi ile 41 (%91.2) izolatın aynı baz dizilimine sahip olan blaOXA-48/blaOXA-245 gen bölgelerini içerdiği, ikişer (%4.4) izolatın blaOXA-181 ve blaOXA-244 gen bölgelerini içerdiği tespit etmişlerdir [83].

Samastı ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise: Karbapenem dirençli suşlarda blaOXA-48 pozitifliği %55, blaNDM-1 pozitifliği %37,4, blaKPC ve blaVIM-1 pozitifliği %1,1

olarak tespit edilmiştir. Toplam 10 suşta farklı direnç genlerinin birlikteliği tespit edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen suşların 73'ünde klonal ilişkiye bakılmış olup 16 farklı grup saptanmıştır. Yirmi suş ise başka hiçbir suş ile klonal olarak ilişkili bulunmamıştır. Karbapenem direncine neden olan en yaygın direnç geni ise Türkiye'de endemik olduğu bilinen blaOXA-48 geni olduğu kanısına varılmıştır [84].

Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile NDM-1 ilk kez *K. pneumoniae* ST15'te tespit edilen Asya ülkelerinin izolatlarında tanımlamıştır [78]. Rimrang ve arkadaşları NDM-1'in genellikle GSBL genleri ile birlikte bulunduğunu belirtmiştir [79].

Duin ve Doi'nin yaptığı çalışmada KPC ABD'de en çok rastlanan direnç geni olduğu tespit edilmiş. Yunanistan ve İtalya gibi Avrupa ülkelerinde de yaygın olarak gözlenmiştir. NDM-1'in ise Hindistan başta olmak üzere, Danimarka, polonya gibi Avrupa ülkelerinde de sıklığı yüksek olarak nitelendirilmiştir [9].

Su ve arkadaşlarının ülkemizde yaptığı çalışmada, 152 karbapenem dirençli izolatın 113'ünde (% 74,3) en az 1 karbapenemaz geni tespit edilmiştir. OXA-48 (% 69.7) en yaygın karbapenemaz olarak bulunmuş ve bunu ardından VIM, NDM ve IMP izlemiştir, test edilen izolatların hiçbiri KPC-pozitif saptanamamıştır. Seksen altı izolatta (% 56.6) CTX-M ve 65 izolatta hem OXA-48 hem de CTX-M tespit edilmiştir. Enterobacterales karbapenemaz üretiminin yıllar içinde önemli ölçüde arttığını savunmuşlardır [88].

Villa ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *K. pneumoniae* ST307, son beş yıl içinde dünya çapında ortaya çıkmasından bu yana yaygın yüksek riskli ve klinik olarak uygun klonlardan biri olmaya aday gösterilmiştir. *K. pneumoniae* ST307 soyu genellikle kapsüllü olduğu, kompleman aracılı öldürmeye karşı daha yüksek direnç gösterdiği, yeni virülans dizilerine sahip olduğu ve KPC kodlayan plazmidlerle ilişkili olduğu saptanmıştır [77].

Çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* suşlarının arasında en az rastlanılan ST307 sekans tipine ait 2 izolatta görülen KPC (%4) genidir. KPC pozitif saptanan örnekler Türkiye-Kayseri' den izole edilmiştir. Bu iki izolatın taşıdığı plazmid tiplerinin de aynı olduğu tespit edilmiştir.

Bizim çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae* suşları arasında en sık rastlanılan karbapenemaz geni NDM geni olmuştur. 25 (%50) izolatta bulunan NDM genlerinin

%48'i ST15 sekans tipine aittir. Bunlardan 17 tanesi Irak örneklerine 8 tanesi ise Türkiye örneklerine aittir.

OXA geni örneklerimizin %40'ında tespit edilmiştir. Ancak, Türkiye'ye ait 25 *Klebsiella pneumoniae* suşunun 19'unda (%76) OXA geni saptanmış ve Türkiye suşları arasında en çok rastlanılan karbapenemaz geni olmuştur. ST15 sekans tipine sahip 16 (%32) suşta görülen GES geninin tamamı GES-20 olarak karakterize edilmiştir. Bunların 11 tanesi Türkiye ve 5 tanesi Irak izolatlarındandır. Çalışılan suşlar içinde *IMP* ve *VIM* türü karbapenemaz enzimlerine rastlanılmamıştır.

GSBL üreten suşlardan ilk olarak tesbit edilen beta-laktamaz TEM β -laktamazlarıdır. TEM β -laktamaz ilk olarak Yunanistan'da bir hastadan izole edilen *E. coli* suşunda saptanmıştır. Daha sonra yapılan birçok çalışmada tespit edilmiştir [94].

Öksüz ve ark. [96] yapmış olduğu bir çalışmada *K. pneumoniae* suşlarında TEM, SHV ve CTX-M β -laktamaz genleri PCR yöntemi ile araştırılmıştır. *K. pneumoniae* suşlarında β -laktamaz oranları TEM % 64.3, SHV % 92.9, ve CTX-M % 64.3 olarak bulunmuştur.

Esen ve ark. [95] yaptıkları çalışmada 83 *K. pneumoniae* suşunda % 69.9 TEM, % 59 oranında SHV genlerini saptamışlardır.

Feizabadi ve arkadaşlarının yaptığı çalışma fenotipik doğrulama testi ile *K. pneumoniae* olduğu tespit edilen GSBL kodlayan genlerin prevalansı şu şekilde bulunmuştur: blaTEM% 54 (n = 48), blaSHV% 67,4 (n = 60), blaCTX-M-I % 46,51 (n = 40) ve blaCTX-M-III% 29 (n = 25). Bla_{CTX-M-II} ve bla_{CTX-M-IV} tespit edilememiş. Tüm blaTEM tipleri blaTEM-1 olarak karakterize edilmiş ve tüm blaCTX-M-I blaCTX-M-15 olarak tanımlanmıştır. SHV tipleri SHV-5, SHV-11 ve SHV-12 olarak karakterize edilmiştir [85].

Tawfik ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada % 89,1'i SHV, % 70,9'u TEM ve % 36,4'ü CTX-M üreten *K. pneumoniae* suşları bulunmuştur. *K. pneumoniae* SHV-12'nin hâkim olduğu görülmüş ve CTX-M-15'in Suudi Arabistan'da ortaya çıkışı vurgulanmıştır [89]. Zaniani ve arkadaşlarının İran'da yaptığı çalışmada ise *K. pneumoniae*'nin % 56.1'inin GSBL ürettiğini bulunmuştur. İzolatlarda bulunan SHV ve TEM sıklığı sırasıyla % 14.4 ve % 20.6 olarak kayda geçmiştir [90].

Bizim çalışmamızda, *K. pneumoniae* suşlarında %70 oranında TEM beta laktamaz geni saptanmıştır. 32 tanesi TEM-1 olarak belirlenmiştir. (19 Türkiye ve 13 Irak). Diğer 2 tanesi TEM-171, TEM-145 taşımakta olup Türkiye izolatlarından. TEM-183 geni saptanan tek örnek Irak izolatıdır. SHV β -laktamaz geni oranı %34 (n=17) olarak saptanmıştır. SHV direnç geni saptanan 17 *K. pneumoniae* suşunun 10' u Türkiye 7' si Irak izolatlarına aittir. CTX-M genlerine özgül primerler kullanılarak yapılan PCR sonucu 50 *Klebsiella spp.* izolatlarının hiçbiri pozitif bulunmamıştır

Clancy ve arkadaşları; porinler, beta-laktamların ve diğer moleküllerin periplazmik aktif bölgelere geçişine izin veren dış zar kanallarıdır. Karbapenem kullanımı, *K. pneumoniae* mutantlarının oluşumunu tetikleyerek major dış membran porinleri olan OmpK35 ve/veya OmpK36 'nın kaybına (gen ekspresyonundaki azalma) yol açabilmektedir. OmpK36 mutasyonları ile bağlantılı olarak yüksek karbapenem MİK'leri görüldüğünü ve bu oluşan mutasyonlar porin kanalını değiştirebilir ve karbapenem alımını azaltabilir olduğu tespit edilmiştir [80].

Çalışmamızda yüksek MİK değerlerine sahip olup fakat direnç genleri tespit edilemeyen üç izolat bulunmaktadır (29,30,31). Irak'tan elde edilen bu izolatlarda porin mutasyonlarının olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca bu izolatların en az üç farklı en fazla yedi farklı plazmid içerdikleri tespit edilmiştir.

Ünlü ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, gen transferi farklı bakteriyel suşları arasında antimikrobiyal direnç belirleyicilerinin yayılması için ana mekanizma olduğunu ve genellikle plazmidler içerdiğini, ancak plazmidler tüm enterik bakterilerde aynı frekansta bulunmadığını, bazı plazmidlerin sadece bazı suşlarda yüksek frekansa sahip olabileceğini belirtmişlerdir [87].

Zhou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, PBRT analizi ile izolatların çoğunda IncR (% 66.0) ve IncFII (% 64.9) replikon türlerinin varlığını gösterilmiş, bunu IncFIB (% 46.4) ve IncX3 (% 16.5) takip etmiştir. *K. pneumoniae*'de baskın replikon tipleri IncFII ve IncR bulunmuştur [97].

Barbadoro ve arkadaşlarını yaptığı çalışmada, plazmid tiplemesi yapılan *K. pneumoniae* suşlarında görülen en yaygın replikon tipleri FIIK, FIB KQ olarak bulunmuştur [98].

Bizim çalışmamızda, 14 replikonun tamamı *Klebsiella spp.* suşlarında tesbit edilmiştir. 25 *Klebsiella Pneumoniae* izolatlarının tümünde birden fazla plazmid replikonu tespit

edilmiştir. PBRT testi ile 25 suştan 24'ünün I1γ (IncI1γ), 20'sinin FIIk (IncFIIk) ve 18'inin A/C (Inc A/C) replikonlarını taşıdığı görülmüştür.

Bu Çalışmada elde ettiğimiz bulgular ülkemizdeki ve orta doğu ülkeleri ile verilerle benzerlik göstermektedir. Farklılıkların ise antibiyotik direnç profilinin değişmesi veya coğrafi nedenlerden olduğu düşünülmektedir. Literatüre ve çalışmamıza bakıldığında orta doğu ülkelerinde antibiyotik direncinin artış gösterdiği söylenebilir.

4.2.Sonuç ve Öneriler

2016 ve 2019 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerinde üreyen *Klebsiella spp.* İzolatlarında fenotipik testler sonucu 42 meropenem dirençli ve 8 meropenem duyarlı toplam 50 örneğin (25 Türkiye, 25 Irak) beta-laktamaz genleri ve plazmid içeriği moleküler yöntemler ile karakterize etmek amacıyla yaptığımız çalışmanın sonucunda aşağıdaki veriler elde edildi.

- CTX-M, TEM, SHV, OXA, GES, VIM, KPC, NDM ve IMP GSBL direnç genleri ve OmpK35, OmpK36 porin genleri çalışılmıştır.
- *K. pneumoniae* suşlarında β-laktamaz gen oranları TEM %70, NDM %50, OXA %40, SHV %34, GES %32, KPC %4, oranında bulunmuştur.
- Çalışmamızda VIM, IMP ve CTX-M genlerine rastlanmamıştır.
- OmpK35 ve OmpK36 porin genleri ise suşların tamamında beklenen büyüklükte ampikon üretmiştir ve dizi analiziyle doğrulanmıştır.
- Karbapenemlere dirençli olup herhangi bir direnç geni saptanmayan 3 suşta karbapenem direncinden sorumlu mekanizmanın porin kaybı ile birlikte olabileceği düşünülmüştür.
- 25 *Klebsiella Pneumoniae* izolatlarının tümünde birden fazla plazmid replikonu tespit edilmiştir

Karbapenem dirençli izolatların birden fazla karbapenemaz kodlayan gen ile direnç geliştirebildikleri tespit edilmiştir. Suşlar arasındaki ilişkinin incelenmesi için PFGE gibi daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca dış zar proteini (OMP) analizi yapılmasında dirençmekanizmasını belirlemek için faydalı olacaktır. Bu çalışmada

Klebsiella pneumoniae suşlarında karbapenem direnci moleküler yöntemlerle araştırılmış ve plazmid tipleri belirlenmiştir. Ancak bu dirence sebep olan effluks(pompa) sistemlerinin araştırılması, protein profillerinin karşılaştırılması bu çalışma kapsamına dahil edilememiş olması araştırmamızın eksiklikleri olarak görülebilir.

KAYNAKÇA

1. 2014. European centre for disease prevention and control (ECDC). (http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/basic_facts/Pages/basic_facts.aspx), (Mayıs 2019)
2. Rex, JH., Goldberger, M., Eisentein, BI., Harney, C., 2014. The evolution of the regulatory framework for antibacterial agents. Ann. N.Y. Acad. Sci. **ISSN 0077-8923. doi: 10.1111/nyas.12441.**
3. 2013. Centers for disease control and prevention (CDC) Antibiotic resistance threats in the United States. (<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>), (Mayıs 2019).
4. 2008. The European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) Annual Report 2007. The EARSS Management Team, members of the Advisory Board, and national representatives of EARSS, Bilthoven, The Netherlands. [ISBN: 978-90-6960-214-1].
5. Aktas, Z., Satana, D., Kayacan, C., Ozbek, B., Gurler, N., Somer, A., Salman, N., Aydin, AE., 2012. Carbapenem resistance in Turkey: repeat report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and first report on IMP-1 Beta-Lactamase in *Escherichia coli*. **African Journal of Microbiology Research** 6(17): 3874-78.
6. Kaper, JB., Nataro, JP., Mobley, HLT., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews. **Nature Reviews Microbiology** 2: 123-40.
7. Logan, LK., Weinstein, RA., 2017. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. **The Journal of Infectious Diseases**, 15;215(supp-1):S28-S36.
8. Metan, G., Akova, M., 2016. Reducing the impact of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* on vulnerable patient groups: what can be done? Curr Opin Infect Dis. 29(6):555-560.
9. van Duin, D., Doi, Y., 2017., The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Virulence**, 8(4):460-469.

10. Özinel, MA., Topçu, AW., Söyletir. G., Doğanay, M., 2008. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Cilt 2. Nobel Tıp Kitabevi. İstanbul, s.82-2126/2135.
11. Mutlu, G., İmir, T., Cengiz, T., Ustaçelebi, Ş., Tümbay, E., Mete, Ö., 1999. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi. Ankara, 471-517/1339.
12. Özkuyumcu, C., Dürdal, US., Sancak, B., Alp, A., Sarıbaş, Z., Çakar, A., 2009. Hacettepe Mikrobiyoloji Serisi-1, Klinik Bakteriyoloji El Kitabı. Güneş Kitabevi. Ankara, 103-121.
13. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., 2017 Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Chapter 6. Yedinci baskı. Wolters Kluwer. s.259-264.
14. Eroğlu, Ö., Cömert, F., Külah, C., Aktaş, E., 2007. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kökenlerinde enzim tiplerinin izoelektrik odaklama yöntemi ile belirlenmesi. **Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi**, 37 (2) : 76-84.
15. Podschun, R., Ullmann, U., 1998. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(4): 589-603.
16. Nataro, JP., Bopp, CA., Fields, PI., Versalovic, J., Carroll, KC., Funke, G., Jorgensen, JH., Landry, ML., Warnock, DW., 2011. *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. Manual of Clinical Microbiology, 10th edition, Volume 1, ASM press, Washington, s.603-626.
17. Mahon, CR., Lehman, DC., Manuselis, G., 2007. Textbook of Diagnostic Microbiology. Elsevier, Üçüncü basım, s.512-513.
18. Bilgehan, H., 2000. Klinik Mikrobiyoloji, Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları. Barış yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, s.1-103/704
19. Brisse, S., Grimont, F., Grimont, PAD., 2006. The Genus *Klebsiella*. Springer, New York, s.975-982.
20. NCBI, National Center for Biotechnology Information. (Web sayfası: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Tree&id=570&lvl=3&keep=1&srchmode=1&unlock>), (Erişim tarihi: Eylül 2020)
21. Brooks, GF., Jawetz, E., Melnick, JL., Adelberg, EA., Carroll, KC., 2013. Medical Microbiology 26th Edition. McGraw-Hill, New York, s.864

22. Podschun, R., Ullmann, U., 1998. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, 11(4):589-603.
23. Dalhoff, A., Janjic, N., Echols, R., 2006. Redefining Penems. **Biochemical Pharmacology**, 71(7): 1085-95.
24. Chaudhry, S.D., Veve, M.P., Wagner, J.L., 2019. Cephalosporins: A focus on side chains and β -Lactam cross-reactivity. **Pharmacy**, 7(103): 5-16.
25. Murray, PR., Baron, E., Jorgensen, JH., Landry, ML., Pfaller, MA., 2009. Medical Microbiology. Klinik Mikrobiyoloji. 9. Baskı, cilt 2. Çeviren Başustaoglu, A., Atlas Kitapçılık, Ankara, 1077/1083.
26. Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S., 2008. Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 285/329.
27. Cengiz, T., 2004. Antibiyotik ve Kemoteropatiklerin Etki Mekanizmaları I-II. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji. 1. Baskı. Güneş Kitabevi Ltd. Şti. Ankara, 246/266.
28. Mandell, GL., Bennett, JE., Dolin, R., 2005.cephalosporins, 294-
311. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eds: DR. Andes, WA. Craig). Sixth edition, Elsevier Churchill Livingstone Inc, Pennsylvania
29. Kayaalp, SO., 2000. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. Baskı. Hacettepe-TAŞ, Ankara, 200/238.
30. Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C., Astilean, A., 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 12(22): 6-15
31. Pais, P., Khurana, R., George, J., 2002. Urinary tract infections: a retrospective survey of causative organisms and antibiotics prescribed in a tertiary care setting. **Indian Journal Pharmacology**, 34(4): 278-280.
32. Demir, N., 2006. Gram Negatif Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üretimine Katkıda Bulunan Çeşitli Risk Faktörlerinin Araştırılması., Sağlık Bakanlığı Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul, s42.

33. Oelschlaeger, P., Ai, N., Duprez, KT., Welsh, WJ., Toney, JH., 2010. Evolving carbapenemases: can medicinal chemists advance one step ahead of the coming storm ? **Journal of Medicinal Chemistry**, 53 (8): 13–27.
34. Bassetti, M., Nicolini, L., Esposito, S., Righi, E., Viscoli, C., 2009. Current status of newer carbapenems. **Current Medicinal Chemistry**, 16(5): 64–75.
35. Gülay, Z., 2003. Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller. **Ankem Dergisi**, 17(3): 192-204.
36. Sili, U., Mert, A., 2010. 1986'dan 2010'a beta-laktamaz inhibitörleri. **Ankem Dergisi**, 24(2): 28-32.
37. Livermore, DM., 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews** 8(4): 557-84.
38. Forbes, A., Sahm, F., Weissfeld, S., 2002. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology 11th edition. Mosby London, s.1069/ 214-220.
39. Ananthan, S., Subha, A., 2005. Cefoxitin resistance mediated by loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 23(1): 20-3.
40. Bush, K., Jacoby, GA., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54(3):969-76.
41. Aydın, D., Başustaoğlu. A., 2010. Antibakteriyel Ajanlar." Tıbbi Mikrobiyoloji". Altıncı baskı. Atlas kitapçılık. Ankara, s.199-208
42. Poirel, L., Nordman, P., 2002. Acquired carbapenem hydrolysing beta-lactamases and their genetic support. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, 3(2): 117-27.
43. Seo, YB., Lee, J., Kim, YK., Lee, SS., Lee, J., Kim, HY., Uh, Y., Kim, H., Song, W., 2017. Randomized controlled trial of piperacillin tazobactam, cefepime and ertapenem for the treatment of urinary tract infection caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. **BMC Infectious Diseases**, 17(404):12879-017-2502
44. Garcia, CP., Rubilar, PC., Vicentini, HD., Román, GJC., León, CE., Muñoz, CG., Dominguez, M., Gonzalez, G., Bello, H., Labarca, J., 2011. Clinical and molecular characterization of ESBL-producing enterobacteria isolated from bacteremia in a university hospital. **Revista Chilena de Infectologia**, 28(6):563-71.

45. Winokur, PL., Brueggemann, A., DeSalvo, DL., Hoffmann, L., Apley, MD., Uhlenhopp, EK., Pfaller, MA., Doern, GV., 2000. Animal and human multidrug resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44(10): 2777-83.
46. Dağlar, D., Öngüt, G., 2012. Genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 12(1): 1-9.
47. Sharma, J., Sharma, M., Roy, P., 2010. Detection of TEM and SHV genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary care hospital from India. **Indian Journal Of Medical Research**, 132: 332-6.
48. Poirel, L., Bonnin, RA., Nordmann, P., 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative rods. **Infection Genetics and Evolution**, 12(5): 883-93.
49. Grover, CN., Sahni, AK., Bhattacharya, S., 2013. Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. **Medical Journal Armed Forces India**, 69(1): 4-10.
50. Kliebe, C., Nies, BA., Meyer, JF., Tolxdorff-Neutzling, RM., Wiedemann, B., 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 28(2):302–307
51. Poirel, L., Heritier, C., Podglajen, I., Sougakoff, W., Gutmann, L., Nordmann, P., 2003. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a Chromosome-Encoded SHV β -Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 47(2): 755–758
52. Bradford, PA., 2001. Extended-Spectrum-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**, 14(4): 933–951.
53. Bonnet, R., Sampaio, JLM., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., 2000. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, 44(7): 1936–1942
54. D'Andrea, MM., Arena, F., Pallecchi, L., Rossolini, GM., 2013. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal Medical Microbiology**, 303(6-7): 305–317

55. Carattoli, A., 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 53(6): 2227–2238
56. Hall, LMC., Livermore, DM., Gur, D., Akova, M., Akalin, HE., 1993. OXA-11, An Extended-Spectrum Variant of OXA-10 (PSE-2) β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 37(8): 1637-44.
57. Bush, K., Jacoby, GA., Medeiros, AA., 1995. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 39(6): 1211-33.
58. Danel, F., Hall, LMC., Duke, B., Gur, D., Livermore, DM., 1999. OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 β -lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 43(6): 1362-66.
59. Atilla, A., Eroğlu, C., Esen, Ş., Sünbül, M., Leblebicioğlu, H., 2012. Hastane kaynaklı *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında per-1 tipi beta-laktamaz sıklığının ve antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 46(1): 1-8.
60. Delbrück, H., Bogaerts, P., Kupper, MB., Rezende de Castro, R., Bennink, S., Glupczynski, Y. 2012. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 β -lactamases. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 56(11):5618-25.
61. Paterson, DL., Bonomo, RA., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, 18(4):657-86.
62. Papp-Wallace, KM., Endimiani, A., Taracila, MA., Bonomo, RA., 2011. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55 (11): 4943–4960
63. Queenan, AM., Bush, K., 2007. Carbapenemases: the versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, 20 (3): 440-458.
64. Nordmann, P., Poirel, L., 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology And Infection**, 8(6):321-33.
65. Rasmussen, BA., Bush, K., 1997. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, 41(2): 223-232.

66. Bratu, S., Landman, D., Alam, M., Tolentino, E., Quale, J., 2005. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter spp.* from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **49**(2) :776-778.
67. Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N., 2007. Class A carbapenemases. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, **60**(3): 470-482.
68. Giakkoupi, P., Tzouvelekis, LS., Tsakris, A., Loukova, V., Sofianou, D., Tzelepi, E., 2000. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **44**(9):2247-2253.
69. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuhashi, S., 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **35**(1):147-151
70. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., Kato, N., 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **38**(1):71-78.
71. Lauretti, L., Riccio, ML., Mazzariol, A., Cornaglia, G., Amicosante, G., Fontana, R., Rossolini, GM., 1999. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **43**(7):1584-1590.
72. Yong, D., Toleman, MA., Giske, CG., Cho, HS., Sundman, K., Lee, K., 2009. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**, **53**(12):5046-5054.
73. Hsueh, PR., 2010. New Delhi metallo-ss-lactamase-1 (NDM-1): an emerging threat among *Enterobacteriaceae*. **Journal of the Formosan Medical Association**, **109**(10): 685-687.
74. Walther-Rasmussen, J., Hoiby, N., 2006. OXA-type carbapenemases. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, **57**(3):373-383.
75. Cockerill, FR., Wikler, MA., Alder, J., Dudley, MN., Eliopoulos, GM., Ferraro, MJ., Hardy, DJ., Hecht, DW., Hindler, JA., Patel, JB., Powell, M., Swenson, JM., Thomson, RB., Traczewski, MM., Turnidge, JD., Weinstein, MP., Zimmer,

- BL., 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition, 32(2) :10-19
76. Wright, MH., Adelskov, J., Greene, AC., 2017. Bacterial DNA extraction using individual enzymes and phenol/chloroform separation. **Journal of Microbiology**, 18(2):1-3
 77. Villa, L., Feudi, C., Fortini, D., Brisse, S., Passet, V., Bonura, C., Endimiani, A., Mammina, C., Ocampo, A., Jimenez, J.N., Doumith, M., Woodford, N., Hopkins, K., Carattoli, A., 2017. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. **Microbial Genomics**, 3:1-13
 78. Lee, MY., Ko, KS., Kang, CI., Chung, DR., Peck, KR., Song, JH., 2011. High prevalence of CTX-M-15- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. **International Journal Antimicrobial Agents**, 38:160–3.
 79. Rimrang, B., Chanawong, A., Lulitanond, A., Wilailuckana, C., Charoensri, N., Sribenjalux, P., Phumsrikaew, W., Wonglakorn, L., Kerdsin, A., Chetchotisakd, P., 2012. Emergence of NDM-1- and IMP-14a-producing Enterobacteriaceae in Thailand. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 67(11): 2626-30
 80. Clancy, J.C., Chen, L., Hong, J.H., Cheng, S., Hao, B., Shields, R.K., Farrell, A.N., Doi, Y., Zhao, Y., Perlin, D.S., Kreiswirth, B.N., Nguyena, M.H., 2013. Mutations of the *ompK36* porin gene and promoter impact responses of sequence type 258, KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains to doripenem and doripenem-colistin. **Antimicrobial Agents Ands Chemotherapy**. 57(11): 5258-5265.
 81. 2019. The european committee on antimicrobial susceptibility testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. (<http://www.eucast.org>), (Erişim tarihi: Ocak 2021).
 82. Almashat, M.H., 2020. Multilocus Sequence Typing Of Carbapenem Resistant *Klebsiella Pneumonia* Isolates Collected From Turkey And Iraq. Erciyes Üniversitesi, Yüksek lisans tezi, Kayseri, s.70
 83. Kahraman, EP., Toptan, H., Otlı, B., Köroğlu, M., Altındış, M., 2019. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarında blaOXA-48-benzeri genlerin araştırılması. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 53(2):134-143.

84. Samastı, M., Koçoğlu, M.E., Davarcı, İ., Vahaboğlu, H., Çaşkurlu, H., 2019. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenemaz varlığının ve klonal ilişkisinin araştırılması. **Bezmialem Science**, 7(3):186-90
85. Papp-Wallace, K.M., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55(11):4943-4960
86. Diene, S.M., Rolain, J.M., 2014. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, and *Acinetobacter* species (E.P.A). **Clinical Microbiology and Infection**, 63(27)
87. Ünlü, Ö., Aktaş, Z., Tuğrul, H.M., 2018. Analysis of virulence factors and antimicrobial resistance in salmonella using molecular techniques and identification of clonal relationships among the strains. **Microbial drug resistance**, 24(10): 1475-1482
88. Su, H.R., Turhan, Ö., Daloğlu, C.A.E., Ögünç, M.D., Özhak, B., Öngüt, G., Kuşkucu, M.A., Midilli, K., Mamıkoğlu, L., 2020. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacterales* strains isolated from blood cultures in antalya, Turkey. **Journal of Laboratory Medicine**, 51(6):601-605
89. Tawfik, A.F., Alswailem, A.M., Shibl, A., Al-Agamy, M.H., 2011. Prevalence and genetic characteristics of TEM, SHV, and CTX-M in klinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia. **Microbial drug resistance**, 17(3):383-388
90. Zaniani, F.R., Meshkat, Z., Nasab, M.N., Karamadini, M.K., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M.S., Hoseini, M.D., 2012. The prevalence of TEM and SHV genes among extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae*. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, 15(1): 654-660
91. Livermore, D.M., 2002. The impact of carbapenemases on antimicrobial development and therapy. **Current Opinion in Investigational Drugs**, 3(2): 218-24
92. Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M., Mitsuashi, S., 1991. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 35(1): 147-51

93. Baran, I., Aksu, N., 2016. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 20(15): 20.
94. Giamarellou, H., 2005. Multi-drug resistance in gram-negative bacteria that produce extended-spectrum beta-lactamase (ESBLs). **Clinical Microbiology and Infection**, 11(4):1-16.
95. Esen, Ş., Eroğlu, C., Sünbül, M., Leblebicioğlu, H., 2001. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında TEM ve SHV türü beta-laktamazların sıklığı. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 35(1): 37-43.
96. Öksüz, L., Gürler, N., 2009. *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* Suşlarında genişlemiş spektrumlu β -laktamazların tiplendirilmesi ve plazmid profil analizi. **Mikrobiyoloji Bülteni**, 43: 183-194.
97. Zhou, H., Zhang, K., Chen, W., Chen, J., Zheng, J., Liu, C., Cheng, L., Zhou, W., Shen, H., Cao, X., 2020. Epidemiological characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* collected from 17 hospitals in Nanjing district of China. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, 9(15): 2-10
98. Barbadoro, P., Bencardino, D., Carloni, E., Omiccioli, E., Ponzio, E., Micheletti, R., Acquaviva, G., Luciani, A., Masucci, A., Pocognoli, A., Orecchioni, F., D'Errico, M., Magnani, M., Andreoni, F., 2021. Carriage of carbapenem-resistant *Enterobacterales* in adult patients admitted to a university hospital in Italy. **Antibiotics**, 10(61): 2-11

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Aybike BAŞER
Uyruğu: Türkiye (T.C)
Doğum Tarihi ve Yeri: 01.01.1993 - Sivas
Medeni Durum: Evli

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Lisans	CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ, Biyoloji	2015
Lise	Hacı Mehmet Sabancı Lisesi, SİVAS	2010

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görev
2018-Halen	LC Waikiki	Satış Danışmanı
2016-2017	BİLSEM, SİVAS	Öğretmen

YABANCI DİL

İngilizce