

T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEME DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE SUŞLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Çağdaş KOCAMAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ünsal SAVCI

ÇORUM 2023

T.C.

HİTİT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEME DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE SUŞLARINDA KARBAPENEM
DİRENCİNİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Dr. Çağdaş KOCAMAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. Ünsal SAVCI

ÇORUM 2023

Bu tez Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından
TIP19004.22.004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

I. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi aldığım Hitit Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Tezin uygulama aşamasındaki desteklerinden ötürü sayın Doç. Dr. Djursun KARASARTOVA'ya,

Laboratuvarda beraber çalıştığım teknisyen ekibine,

Maddi desteklerinden dolayı Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi ve yardımsever personellerine,

Eğitim sürecime geçmişte katkıda bulunmuş tüm öğretmen ve hocalarıma,

Desteklerini ve sevgilerini her daim hissettiğim anneme, babama ve kardeşime teşekkür ederim.

Bu çalışma Hitit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından TIP19004.22.004 numaralı proje ile desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR	I
II. İÇİNDEKİLER	II
III. ÖZET	V
IV. ABSTRACT	VII
V. KISALTMALAR	IX
VI. TABLO LİSTESİ	XIII
VII. ŞEKİL LİSTESİ	XIV
VIII. RESİM LİSTESİ	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	3
2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi	3
2.1.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri	4
2.1.3. Virülans Faktörleri	5
2.1.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar	10
2.1.5. Tedavi	11
2.2. Karbapenemler	13
2.2.1. Ertapenem	14
2.2.2. Meropenem	15
2.2.3. İmipenem	15
2.2.4. Doripenem	16

2.3. <i>K. pneumoniae</i> 'da Karbapenem Direnci	17
2.3.1. Karbapenemazlar	17
2.3.2. Porin Kaybı/Azalması	24
2.3.3. Efluks Pompaları	25
2.3.4. GSBL/AmpC Üretimi	25
2.4. Karbapenemaz Tespit Yöntemleri	25
2.4.1. Fenotipik Yöntemler	26
2.4.2. Genotipik Yöntemler	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Çalışmaya Alınan Örnekler	35
3.1.1. Bakteri Tanımlaması	35
3.1.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	35
3.2. Kullanılan Besiyerleri	36
3.2.1. %5 Koyun Kanlı Agar	36
3.2.2. Eozin Metilen Blue (EMB) Agar	36
3.2.3. Mueller Hinton Agar (MHA)	36
3.2.4. %15 Gliserollü Brain Heart Infusion Broth	36
3.3. Suşların Canlandırılması	37
3.4. Kombinasyon Disk Testi (KDT)	37
3.4.1. Testin Uygulanması	37
3.4.2. Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması	37
3.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi	38
3.5. PCR Yöntemi ile Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması	38
3.5.1. Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu	38

3.5.2. PCR Yönteminin Uygulanması	40
3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	43
3.5.4. İstatistiksel Analiz	44
4. BULGULAR	45
4.1. Bakteri Suşlarının ve Hastaların Genel Özellikleri	45
4.2. Kombinasyon Disk Testi Sonuçları	46
4.3. PCR Sonuçları	49
4.4. Kombinasyon Disk Testi ile PCR Yönteminin Karşılaştırılması	53
5. TARTIŞMA	56
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	67
7. KAYNAKLAR	68
8. EKLER	92
8.1. Ek1-Etik Kurul Onayı	92

III. ÖZET

Amaç: Klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenemaz varlığının fenotipik ve genotipik yöntemlerle test edilmesi, karbapenemaz enzim tiplerinin dağılımının tespit edilmesi ve test yöntemleri arasındaki korelasyonun belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Mart 2021-Mart 2022 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen klinik örneklerden izole edilen ve karbapenem grubu antibiyotiklerden en az birine dirençli 100 *K. pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Bakterilerin tanımlanması ve antibiyogramı VITEK 2 Compact (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Karbapenemaz direncini belirlemek amacıyla fenotipik yöntem olarak kombinasyon disk testi kullanılmıştır. Genotipik yöntem olarak ise en sık rastlanan karbapenemaz direnç genleri olan *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* ve *bla_{OXA-48}*'i hedefleyen iki farklı multipleks polimeraz zincir reaksiyonu uygulanmıştır.

Bulgular: Kombinasyon disk testi ile tüm örneklerin karbapenemaz ürettiği saptanmış olup 87 (%87) izolatta OXA-48 benzeri, 13 (%13) izolatta MBL pozitifliği tespit edilmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile 91 izolatta pozitiflik saptanmış olup 76 (%76) izolat OXA-48, 13 (%13) izolat NDM, 2 (%2) izolat OXA-48 + NDM olarak sonuçlanmıştır. 9 (%9) örnekte araştırılan direnç genlerine rastlanmamıştır. Hiçbir izolatta KPC, VIM ve IMP gözlenmemiştir. İki test arasındaki uyum %89 olarak saptanmıştır. Kombinasyon disk testinin karbapenemaz varlığını saptama açısından duyarlılığı %100, pozitif prediktif değeri %91 olarak saptanmıştır. Kombinasyon disk testinin sadece OXA-48'e sahip izolatlar için duyarlılığı %100, özgüllüğü %54,1, pozitif prediktif değeri %87,3, negatif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır. Sadece NDM'ye sahip izolatlar için ise tüm değerler %100 olarak saptanmıştır. OXA-48 + NDM'ye sahip iki izolat kombinasyon disk testi ile OXA-48 benzeri olarak yorumlanmıştır.

Sonuç: Türkiye'de OXA-48'in endemik olduğu düşünüldüğünde en sık saptanan karbapenemazın OXA-48 olması beklenen bir sonuç olmuştur. Kombinasyon disk testi

ucuz maliyeti, uygulama kolaylığı, karbapenemaz direnç mekanizmalarını belirleyebilmesi ve polimeraz zincir reaksiyonu ile büyük ölçüde uyumlu olması bakımından laboratuvarlarda karbapenemaz direnç genlerinin saptanması için kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: *K. pneumoniae*, Kombinasyon disk testi, Karbapenemaz, Karbapenem direnci, OXA-48



IV. ABSTRACT

Investigation of Carbapenem Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains by Phenotypic and Genotypic Methods

Background: The aim of this study is to test the presence of carbapenemase in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical specimens by phenotypic and genotypic methods, to determine the distribution of carbapenemase enzyme types and to determine the correlation between test methods.

Materials and Methods: 100 *K. pneumoniae* strains that were resistant to at least one of the carbapenem group antibiotics and isolated from clinical samples sent to Hitit University Çorum Erol Olçok Training and Research Hospital Microbiology Laboratory between March 2021 and March 2022 were included in the study. Identification and antibiogram of bacteria were performed with the automated system VITEK 2 Compact (bioMérieux, France). Combination disc test was used as a phenotypic method to determine carbapenemase resistance. As a genotypic method, two different multiplex polymerase chain reactions targeting the most common carbapenemase resistance genes, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{OXA-48}, were applied.

Results: It was determined that all samples produced carbapenemase by the combination disc test, and OXA-48-like positivity was found in 87 (87%) isolates and MBL positivity was found in 13 (13%) isolates. Polymerase chain reaction was positive in 91 isolates and 76 (76%) isolates were OXA-48, 13 (13%) isolates were NDM, 2 (2%) isolates were OXA-48 + NDM. In 9 (9%) samples, the investigated resistance genes were not found. KPC, VIM, and IMP were not observed in any of the isolates. The agreement between the two tests was 89%. The sensitivity of the combination disc test for detecting the presence of carbapenemase was found to be 100%, and the positive predictive value was 91%. The sensitivity of the combination disc test for isolates with only have OXA-48 was found to be 100%, specificity 54.1%, positive predictive value 87.3%, negative predictive value 100%. For isolates with only have NDM, all values were determined as

100%. Two isolates with OXA-48 + NDM were interpreted as OXA-48-like by the combination disc test.

Conclusion: Considering that OXA-48 is endemic in Turkey, the most common carbapenemase detected was OXA-48, an expected result. The combination disc test can be used for the detection of carbapenemase resistance genes in laboratories because of its inexpensive cost, ease of administration, ability to identify carbapenemase resistance mechanisms, and being highly compatible with polymerase chain reaction.

Keywords: *K. pneumoniae*, Combination disc test, Carbapenemase, Carbapenem resistance, OXA-48



V. KISALTMALAR

ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ADD	: Artmış Dozda Duyarlı
AmpC	: Ampisilinaz C
AST	: Antimikrobiyal Duyarlılık Testi
ATCC	: American Type Culture Collection
C1q	: Kompleman bileşeni 1q
Carba NP	: Carbapenemase Nordmann-Poirel
CCUG	: Culture Collection University of Gothenburg
CIM	: Karbapenem İnaktivasyon Metodu
cKp	: Klasik <i>K. pneumoniae</i>
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute)
Da	: Dalton
dATP	: Deoksiadenozin Trifosfat
dCTP	: Deoksisitidin Trifosfat
dGTP	: Deoksiguanozin Trifosfat
DHP-1	: Dehidropeptidaz-1
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotit Trifosfat
DPA	: Dipikolinik Asit
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü

dTTP	: Deoksitimidin Trifosfat
eCIM	: Etilendiamin Tetraasetik Asit -modifiyeli Karbapenem İnaktivasyon Metodu
ECOFF	: Epidemiyolojik Sınır Değerler
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
EMB	: Eozin Metilen Blue
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
EuSCAPE	: Avrupa Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacteriaceae</i> Sürveyansı
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (The Food and Drug Administration)
GES	: Guiana Extended Spectrum
GN	: Gram Negatif
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
H ₂ S	: Hidrojen Sülfür
HKP	: Hastane Kaynaklı Pnömoni
hvKp	: Hipervirülan <i>Klebsiella pneumoniae</i>
IMI	: Imipenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase
IMP	: Imipenemase
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonu
KdKp	: Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
KpSC	: <i>K. pneumoniae</i> Tür Kompleksi
LPS	: Lipopolisakkarit

MALDI-TOF MS	: Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrofotometresi (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry)
MBL	: Metallo-beta-laktamaz
mCIM	: Modifiye Karbapenem İnaktivasyon Metodu
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHT	: Modifiye Hodge Testi
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NCTC	: National Collection of Type Cultures
NDM	: New Delhi Metallo-beta-lactamase
NH ₄ HCO ₃	: Amonyum bikarbonat
NMC	: Not Metalloenzyme Carbapenemase
NPD	: Negatif Prediktif Değer
OmpK	: Outer Membrane Protein K
ONPG	: O-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozid
OXA	: Oksasilinaz
PBA	: Fenil boronik asit
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PPD	: Pozitif Prediktif Değer
RNaz A	: Ribonükleaz A
rRNA	: Ribozomal Ribonükleik Asit

SME	: <i>Serratia marcescens</i> Enzymes
TAE	: Tris-Asetik Asit-Etilendiamin Tetraasetik Asit
TKP	: Toplum Kaynaklı Pnömoni
TLR	: Toll-like Receptor
USHİESA	: Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı
VIM	: Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase
VİP	: Ventilatör İlişkili Pnömoni
YBÜ	: Yoğun Bakım Ünitesi
ZnSO4	: Çinko sülfat

VI. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. <i>Klebsiella</i> Tür Kompleksleri ve Türleri	4
Tablo 2. <i>K. pneumoniae</i> Alt Türleri ve <i>K. oxytoca</i> 'nın Biyokimyasal Özellikleri	5
Tablo 3. cKp ve hvKp Patotiplerinin Karşılaştırılması	7
Tablo 4. Bush-Jacoby ve Ambler Sınıflaması	18
Tablo 5. Karbapenemaz Üreten <i>Enterobacterales</i> İçin Klinik Sınır Değerler ve Tarama Eşik Değerleri	26
Tablo 6. Kombinasyon Disk Testi ile Karbapenem Direncinin Belirlenmesi	28
Tablo 7. Kombinasyon Disk Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	38
Tablo 8. Kullanılan Primerler ve Bant Büyüklükleri	40
Tablo 9. <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} ve <i>bla</i> _{OXA-48} İçin PCR Karışımı	41
Tablo 10. <i>bla</i> _{VIM} ve <i>bla</i> _{IMP} İçin PCR Karışımı	42
Tablo 11. <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} ve <i>bla</i> _{OXA-48} İçin PCR Protokolü	43
Tablo 12. <i>bla</i> _{VIM} ve <i>bla</i> _{IMP} İçin PCR Protokolü	43
Tablo 13. Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Genel Karşılaştırması	53
Tablo 14. Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Genotip Karşılaştırması	54
Tablo 15. OXA-48 İçin Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	55
Tablo 16. NDM İçin Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması	55

VII. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. <i>K. pneumoniae</i> Virölans Faktörleri	6
Şekil 2. Örneklerin Kliniklere Göre Dağılımı	46
Şekil 3. Örneklerin Kültür Türüne Göre Dağılımı	46
Şekil 4. PCR Yöntemine Göre Karbapenemaz Genlerinin Dağılımı	49
Şekil 5. Yatış Yeriine Göre PCR Sonuçları	51
Şekil 6. Kültür Türüne Göre PCR Sonuçları	51
Şekil 7. Cinsiyete Göre PCR Sonuçları	52
Şekil 8. Yaş Gruplarına Göre PCR Sonuçları	52

VIII. RESİM LİSTESİ

Resim 1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 25955 KDT Plak Görüntüsü	47
Resim 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> CCUG 56233 KDT Plak Görüntüsü	47
Resim 3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> NCTC 13443 KDT Plak Görüntüsü	48
Resim 4. OXA-48 Benzeri Pozitif Örneğe Ait KDT Plak Görüntüsü	48
Resim 5. MBL Pozitif Örneğe Ait KDT Görüntüsü	49
Resim 6. Örneklerin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Yorumlanması-1	50
Resim 7. Örneklerin Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi ve Yorumlanması-2	50
Resim 8. PCR ile OXA-48 + NDM Pozitif Saptanan Örneklerin KDT Plak Görüntüsü	54

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella pneumoniae doğada çok çeşitli ortamlarda yaşayabilen, hareketsiz, kapsüllü, *Enterobacteriaceae* ailesinden gram negatif bir basildir (1,2). *Klebsiella* türleri insanlarda nazofarenks ve bağırsaklarda hastalık yapmadan yaşayabilir (2). Kan dolaşımı enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonu (İYE), cerrahi alan enfeksiyonu, pnömoni, endokardit, sepsisemi, intraabdominal enfeksiyon ve menenjit gibi çeşitli enfeksiyonlara neden olan fırsatçı bir bakteridir (3-5).

K. pneumoniae doğal olarak ampisilin, amoksisilin, tikarsilin gibi beta-laktam antibiyotikleri hidrolize edebilen enzimlere sahiptir. Buna ek olarak plazmidler veya aktarılabılır genetik elementler aracılığıyla pek çok antibiyotiğe dirençli hale gelebilir (6). *K. pneumoniae* genomlarında 400'ün üzerinde kazanılmış direnç geni mevcuttur ve *Escherichia coli* ile kıyaslandığında yaklaşık 2 kat fazla direnç genine sahip olabileceği bilinmektedir (7).

1980'lerin başında penisiline dirençli *Enterobacteriaceae* tedavisi için üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanılmaya başlanması şu anda dünya çapında yaygın olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) denilen enzimlerin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. 1990'larda GSBL üreten *K. pneumoniae* tedavisinde karbapenemler sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır ve o zamanlardan beri karbapenem dirençli suşların artması endişe uyandırmıştır (6). Çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae*'da antimikrobiyal direncin yönetimi bulaşıcı hastalıklar alanında büyük bir zorluk teşkil etmektedir (8). 2017 yılında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan bakterilerin bir listesini yayınlamış ve bunları önceliklerine göre kritik, yüksek ve orta olarak gruplandırmıştır. Bu listeye göre karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* kritik grupta bulunmaktadır (5).

K. pneumoniae'da karbapenem direnci karbapenemleri parçalayabilen enzimleri kodlayan karbapenemaz genlerinin kazanılması ve/veya porin ekspresyonunda azalma ile beraber beta-laktamazların aşırı üretiminin kombinasyonu şeklinde iki temel mekanizma

üzerinden gerçekleşmektedir (9,10). *K. pneumoniae*'da karbapenem direnci fenotipik ve genotipik yöntemlerle test edilebilir. Fenotipik olarak Modifiye Hodge testi (MHT), CarbaNP testi, karbapenem inaktivasyon metodu, kombinasyon disk testi (KDT), matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanlı kütle spektrofotometresi (MALDI-TOF MS) ve immunokromatografik testler kullanılmaktadır (11). Genotipik olarak ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve mikroarray gibi teknikler kullanılmaktadır ve bu testler altın standart olarak kabul edilmektedir (12). PCR ile moleküler tespit karbapenemazların belirlenmesi için altın standart olmaya devam etse de pratik olmayan klinik kullanım, yüksek maliyet, ekipman gereksinimleri nedeniyle daha az tercih edilmektedir (12,13).

Bu çalışmada Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde klinik örneklerden izole edilen karbapeneme dirençli *K. pneumoniae* suşlarında karbapenem direnç mekanizmasının fenotipik olarak kombinasyon disk testi, genotipik olarak en sık görülen 5 karbapenem direnç genini hedefleyen PCR yöntemi ile belirlenmesi, fenotipik ve genotipik testler arasında korelasyonun saptanması, hastanemizdeki epidemiyolojinin tespit edilmesi, yaygın enzim tipi/tiplerine yönelik kullanılması muhtemel tedavilerin belirlenmesine zemin hazırlaması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

2.1.1. Tarihçe ve Taksonomi

Klebsiella cinsi ilk kez 1882'de bir rinoskleroma hastasından izole edilmiştir. Daha sonra Friedlander 1882'de, pnömoniden ölen bir hastanın akciğerlerinden aynı bakteriyi izole etmiştir ve bu bakteri Friedlander basili olarak adlandırılmıştır. *Klebsiella* ismi, Trevisan tarafından 1885'te Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'i onurlandırmak için Friedlander basilinın yerine ilk kez kullanılmıştır (14).

Klebsiella cinsi, *Enterobacterales* takımının *Enterobacteriaceae* ailesine ait bir bakteridir (15). *Klebsiella* cinsi, *K. pneumoniae* tür kompleksine (KpSC) ait türler ve KpSC ile ortalama %90 nükleotit benzerliği olan diğer *Klebsiella* türleri dahil olmak üzere çok çeşitli türler içermektedir. Günümüzde KpSC'ye ait *K. pneumoniae* (Kp1), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (Kp2), *K. variicola* subsp. *variicola* (Kp3), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (Kp4), *K. variicola* subsp. *tropica* (Kp5), *K. quasivariicola* (Kp6) ve *K. africana* (Kp7) olmak üzere 7 filogrup bulunmaktadır ve *K. pneumoniae* 1. filogrupta yer almaktadır (16-18). Eskiden KpSC'ye ait tüm türler biyokimyasal veya proteomik testler tarafından *K. pneumoniae* olarak isimlendirilse de modern tür tanımlama yöntemlerinin kullanıma girmesiyle birlikte KpSC bugünkü halini almıştır (16). Kp1'e ait *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* olmak üzere 3 adet alt tür tanımlanmıştır (18). *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* ve *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae*'dan türetilen klonlar olarak kabul edilmektedir (16). Tablo 1'de KpSC tür kompleksi ve üyeleri, *K. oxytoca* tür kompleksi ve üyeleri ve tiplendirilmemiş *Klebsiella* türleri gösterilmiştir.

Tablo 1. *Klebsiella* Tür Kompleksleri ve Türleri (16-18)

Tür Kompleksi	Tür
<i>K. pneumoniae</i> tür kompleksi (KpSC)	<i>K. pneumoniae</i> (Kp1) <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> (Kp2) <i>K. variicola</i> subsp. <i>variicola</i> (Kp3) <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> (Kp4) <i>K. variicola</i> subsp. <i>tropica</i> (Kp5) <i>K. quasivariicola</i> (Kp6) <i>K. africana</i> (Kp7)
<i>K. oxytoca</i> tür kompleksi	<i>K. oxytoca</i> <i>K. grimontii</i> <i>K. huaxiensis</i> <i>K. michiganensis</i> <i>K. pasteurii</i> <i>K. spallanzanii</i>
Tiplendirilmemiş	<i>K. aerogenes</i> <i>K. indica</i>

2.1.2. Morfolojik ve Biyokimyasal Özellikleri

K. pneumoniae, 0,3 ila 1,0 µm genişliğinde ve 0,6 ila 6,0 µm uzunluğunda gram negatif, fakültatif anaerobik bir basildir. Polisakkarit yapıda kapsülü vardır. Spor formasyonu göstermez. Hareketsizdir (19).

5-10 °C’de üremez, 25-37 °C arasında iyi üreme gösterir. 41 °C’de üreyebilir. MacConkey ve Eozin Metilen Blue (EMB) agarda tipik olarak büyük, mukoid ve nemli, pembe-mor renkte opak koloniler oluşturur (19).

Enterobacteriaceae ailesinin bir üyesi olduğu için katalaz pozitif, oksidaz negatiftir ve glikozu fermente eder. Ayrıca laktoz ve sükröz fermentasyonu da gösterir ve glikozdan gaz oluşturur. Hidrojen sülfür (H₂S) üretimi gözlenmez (20). Tablo 2’de *K.*

pneumoniae'nın 3 alt türü ve *K. oxytoca*'nın tanımlanması için kullanılan biyokimyasal testler ve sonuçları gösterilmiştir.

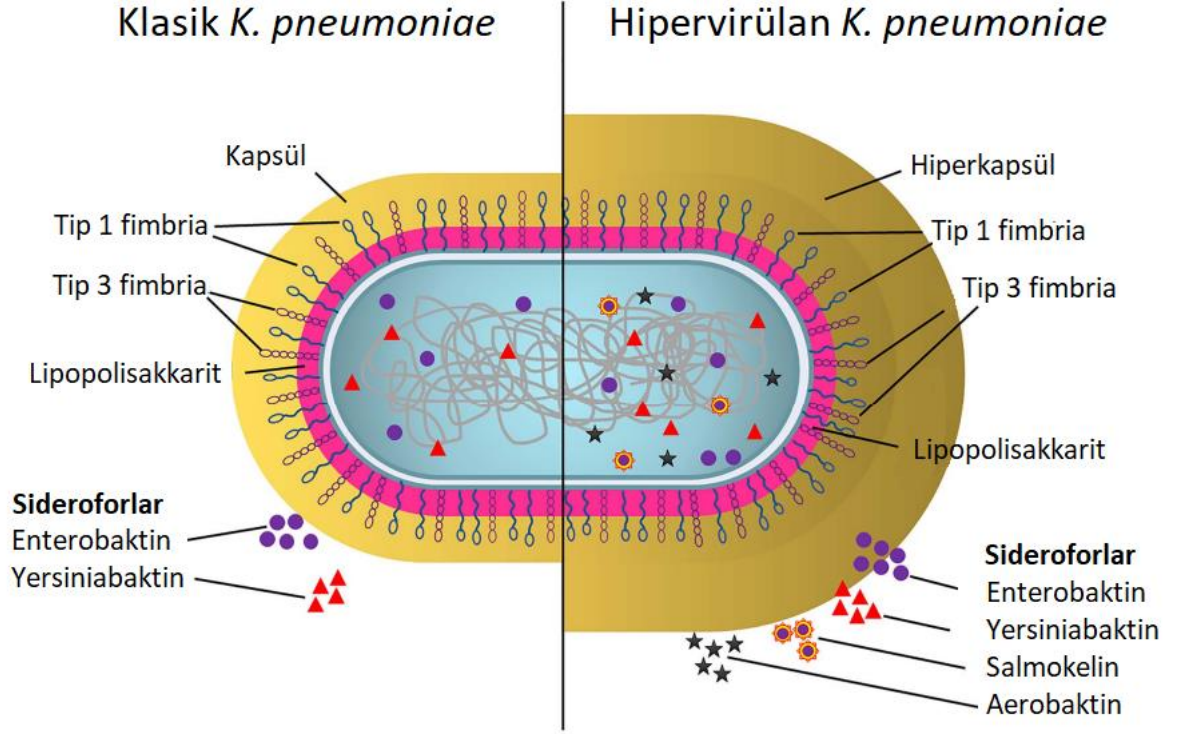
Tablo 2. *K. pneumoniae* Alt Türleri ve *K. oxytoca*'nın Biyokimyasal Özellikleri (20)

Biyokimyasal Test	<i>K. pneumoniae</i> subs. <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subs. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subs. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. oxytoca</i>
İndol	-	-	-	+
Metil Red	-	+	+	D (%20 +)
Voges-Proskauer	+	-	-	+
Sitrat	+	D (%30 +)	-	+
Üreaz	+	-	-	+
Lizin Dekarboksilaz	+	D (%40 +)	-	+
Ornitin Dekarboksilaz	-	-	-	-
ONPG	+	D (%80 +)	-	+
Malonat	+	-	+	+

D: Değişken, ONPG: O-nitrofenil-beta-D-galaktopiranozid

2.1.3. Virülans Faktörleri

K. pneumoniae'nin kapsül, lipopolisakkarit (LPS), fimbria, siderofor gibi çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır (21-27). Şekil 1'de virülans faktörleri gösterilmiştir.



Şekil 1. *K. pneumoniae* Virülans Faktörleri (24)

K. pneumoniae'nin klasik ve hipervirülan olmak üzere 2 farklı patotipi vardır (21-23,29). 1980'lerde Tayvan'da ilk kez endoftalmi ile birlikte karaciğer absesine neden olan bir *K. pneumoniae* vakası rapor edilmiş ve etken organizma hipervirülan *K. pneumoniae* (hvKp) olarak tanımlanmıştır. O zamandan beri hvKp, klasik *K. pneumoniae* (cKp)'ya ek olarak hipervirülans nedeniyle yüksek patojenite ve mortalite ile ilişkili başka bir patotip olarak kabul edilmiştir (22). Tablo 3'te cKp ve hvKp arasındaki önemli farklar gösterilmiştir.

Tablo 3. cKp ve hvKp Patotiplerinin Karşılaştırılması (22,23)

Parametreler	cKp	hvKp
Enfeksiyonun Kaynağı	Hastane	Toplum
Konağın Durumu	Bağıışıklığı baskılanmış	Sağlıklı
Coğrafi Bölge	Tüm dünya	Güneydoğu Asya
Enfeksiyon Alanı	İdrar yolu, akciğer, kan dolaşımı	Karaciğer, göz, deri, meninks
Enfeksiyonun Yayılımı	Yaygın değil	Yaygın
Polimikrobiyal Enfeksiyon	Genelde polimikrobiyal	Genelde monomikrobiyal
Fenotip	Non-hipermukovisköz	Hipermukovisköz
Yaygın Serotipler	K1–K79	K1, K2, K5, K16, K20, K54, K57, KN1
Sideroforlar	Enterobaktin, yersiniabaktin	Enterobaktin, yersiniabaktin, salmokekin, aerobaktin

2.1.3.1. Kapsül

Kapsül, bakterinin en dış katmanında bulunur ve konakçı ile arasındaki ilk etkileşimde yer alır (23). *K. pneumoniae*'nin yüzeyini çevreleyen kapsül, bakteriye mukoid bir fenotip kazandırır ve ana virülans faktörlerinden biri olarak kabul edilir (22). Kapsül, bakteriyi doğuştan gelen bağışıklık tepkisi mekanizmalarından korumada ve opsonizasyondan kaçınmada, epitel hücreleri ve fagositlere yapışmayı azaltmada ve antimikrobiyal peptitler ve kompleman kaskadı tarafından parçalanmayı engellemede çok önemli bir rol oynar (24,25). Kapsül, asidik yapıda polisakkaritlerden meydana gelir ve patojenin sınıflandırılması ve serotiplenmesi, kapsülün K antijenine dayanmaktadır. Günümüzde bildirilen 79 farklı K antijen kapsül serotipi mevcuttur (22,24). Kapsülün, ilk yüzey yapışması ve maturasyon dahil olmak üzere *K. pneumoniae*'da biyofilm oluşumunun farklı aşamalarını etkilediği gösterilmiştir. Kapsül üretimi olmayan mutant suşlarda biyofilm oluşumunun bozulduğu görülmektedir (25).

K1 ve K2 serotipleri genellikle hvKp suşlarında bulunur. Buna ek olarak K5, K16, K20, K54, K57, KN1 de hvKp suşlarında sıklıkla rastlanan serotiplerdir (22). Ayrıca,

hvKp suşlarının bir hiperkapsül ürettiği bilinmektedir, bu da kompleman aracılı veya fagosit aracılı öldürmeye karşı artan direnç katkısında bulunan hiper mukovisköz fenotipi meydana getirir. Ancak, kalın hiperkapsül fiziksel bir bariyer görevi görebilir ve deoksiribonükleik asit (DNA) alımını bozabilir, sonuç olarak yatay gen transferi sınırlanabilir. Bu durum hvKp suşlarındaki antimikrobiyal direnç genlerinin cKp suşlarınınkinden daha az olmasına sebep olabilmektedir (26).

2.1.3.2. Lipopolisakkarit (LPS)

LPS; lipid A, kor ve tekrarlayan oligosakkarit ünitelerinden oluşan O antijeninden meydana gelir ve hem cKp hem de hvKp'de önemli bir virülans faktörü olarak bulunur (22,25). Oligosakkarit tekrarlarındaki varyasyon, yapısal ve işlevsel olarak LPS tiplerinin temelini oluşturur (24). O serotiplerinin sınıflandırılması yıllar içinde birçok kez revize edilmiştir, ancak en son çalışmalar 11 O serotipi olduğunu göstermektedir (27). O1, O2 ve O3 serotipleri tüm enfeksiyonların yaklaşık %80'inden sorumludur (25,28).

Endotoksin olarak da bilinen LPS, bakteriyel septik şokun en güçlü medyatörü olarak kabul edilmektedir. LPS, konak hücrede Toll-like receptor (TLR) 4 ile tanınır ve inflamasyona yol açar (25). Sağlam LPS, sağlam bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkarır ve C1q'nun bakterilere bağlanmasını ve ardından tamamlayıcı yolun aktivasyonunu önler. LPS yapısındaki modifikasyonlar, bakterinin konak hücre immün yanıtından kaçmasını sağlayabilir (29).

LPS ayrıca biyofilm oluşumunda önemli bir faktördür. LPS'nin *K. pneumoniae*'nin cansız yüzeylere ilk bağlanmasında etkili olduğu, dolayısıyla biyofilm oluşumunun erken evrelerinde rol aldığı gösterilmiştir (30).

2.1.3.3. Fimbria

Fimbria, patojenin konak hücre yüzeyine yapışmasına yardımcı olan önemli bir virülans faktörüdür (31). *K. pneumoniae*'da tip 1 ve tip 3 fimbria olmak üzere 2 adet fimbria bulunmaktadır (28). Tip 1 fimbria mannoz içeren reseptörlere bağlanır. Tip 3 fimbrianın kollajen yapıları ile etkileşime girdiği gösterilebilse de spesifik bir reseptörü tanımlanmamıştır. Tip 1 fimbria genelde üroepitelyal hücrelere yapışmada etkilidir, tip 3

fimbria ise trakeal epitel hücreler, renal tübüler hücreler ve akciğer zarı gibi farklı hücre tiplerine yapışmada görev alır (26,32). Tip 1 fimbria, İYE'nin ilk oluşumu için gereklidir ancak *K. pneumoniae*'nin bağırsakta kolonize olma veya akciğeri enfekte etme yeteneği üzerinde hiçbir etkisi yoktur (33).

Tip 3 fimbrianın biyofilm oluşumuyla yakından ilişkili olduğu gösterilmiştir, bununla birlikte tip 1 fimbriaların biyofilm oluşumundaki rolü daha karmaşıktır ve deneysel koşullara ve konak tipine göre farklılıklar göstermektedir (26).

2.1.3.4. Siderofor

Bakteriler için demir, temel metabolik süreçler için gerekli kritik bir elementtir ve hücre dışında sınırlı miktarda demir bulunması, bakteriyel demir alımı için bir zorluk teşkil etmektedir. Sideroforlar, bakterilerin içinde sentezlenen ve hücrelerin dışına salgılanan küçük demir bağlayıcı moleküllerdir, çevresel demire bağlanır ve onu hücrelere geri taşırlar (34). *K. pneumoniae*'de enterobaktin, yersiniabaktin, salmotelin ve aerobaktin olmak üzere 4 adet siderofor tanımlanmıştır ve enterobaktin diğerlerine kıyaslandığında demir iyonuna en yüksek afinite gösteren ve en sık üretilen siderofordur (35). Demire afinitesi en düşük olan siderofor ise aerobaktindir (36). *K. pneumoniae* patotipleri sideroforlar bakımından değişiklik göstermektedir, cKp'de enterobaktin ve yersiniabaktinler ön planda bulunurken, hvKp'de 4 siderofor da sentezlenmektedir (37). Ayrıca hvKp'nin cKp'ye kıyasla 6 ila 10 kat arasında fazla siderofor ürettiği bilinmektedir (38).

K. pneumoniae enfeksiyonu olan konakta enterobaktinin etkisini nötralize etmek için lipokalin-2 üretimi olmaktadır (39). Lipokalin-2 enfeksiyon sırasında nötrofiller dahil olmak üzere birçok hücre tipinden salınan antimikrobiyal özelliklere sahip bir proteindir ve solunum yolu enfeksiyonlarında yapımı artmaktadır (40).

Yersiniabaktin, enterobaktin ile birlikte solunum yolu enfeksiyonlarında yapımı artan bir siderofordur ve lipokalin-2 tarafından nötralize edilemediği için solunum yollarında yüksek bakteriyel yük oluşumuna katkıda bulunmaktadır. Ancak hücre dışındaki transferrin, yersiniabaktinin fonksiyonunu önemli ölçüde azaltmaktadır. Dolayısıyla sadece yersiniabaktin üretimi hastalık oluşumunu önemli ölçüde engellemektedir (41).

Salmokelin, enterobaktinin glikozillenmiş bir formudur ve lipokalin-2 ile nötralize olmaz (42). Salmokelinin, ağırlıklı olarak piyojenik karaciğer apsesine neden olan hvKp suşlarında eksprese edildiği gözlenmiştir (43).

Aerobaktin varlığı her zaman bir hiperkapsül ile ilişkilidir, ancak tüm hiperkapsüllü suşlar bu siderofora sahip değildir (44).

2.1.4. Neden Olduğu Enfeksiyonlar

K. pneumoniae toplum kökenli ve hastane kaynaklı enfeksiyonların yaygın bir fırsatçı patojenidir ve sepsis, pnömoni, İYE, menenjit ve başta karaciğer apsesi olmak üzere çeşitli vücut bölgelerinde pürülan apse gibi geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahiptir (45). İlk olarak 1980'lerde tanımlanan hvKp, karaciğer apseleri ve akciğer, göz, merkezi sinir sistemi, kas-iskelet sistemi ve idrar yollarının metastatik enfeksiyonları ile karakterize toplum kökenli invaziv enfeksiyonlara neden olmasıyla önem kazanmıştır (1,46).

Özellikle gelişmiş batı ülkelerinde, cKp kaynaklı enfeksiyonların çoğu hastanelerde ve uzun süreli bakım tesislerinde görülmektedir (47). Ayrıca cKp, nozokomiyal kaynaklı primer pnömoniye sebep olan nadir gram negatif basillerden biri olması ile ön plana çıkmaktadır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonlarının da en sık sebeplerinden biridir. Bu tür hastane enfeksiyonları, en çok ileri yaş veya altta yatan immün yetmezliği olan hastalar arasında yaygındır ve cKp klasik olarak bu şekilde enfeksiyona yol açar (48). Ancak cKp'nin başta alkoliklerde olmak üzere, toplum kökenli ciddi bir pnömoniye neden olduğu da bilinmektedir. Bu durum hala Afrika ve Asya'da belirli sıklıkta gözlense de Kuzey Amerika ve Avrupa'da giderek daha nadir hale gelmiştir (49).

Buna karşılık hvKp, tipik olarak toplum kökenli ve giderek artan şekilde hastane kökenli enfeksiyonlara da neden olma yeteneğine sahip önemli bir patojen olarak karşımıza çıkmaktadır. cKp'den farklı olarak hvKp, genellikle sağlıklı bireylerde enfeksiyona neden olur (47).

K. pneumoniae'nin neden olduğu pnömoni, toplum kaynaklı pnömoni (TKP) ve hastane kaynaklı pnömoni (HKP) olarak iki farklı şekilde incelenebilir. HKP daha sık görülmektedir. Pnömoni, nozokomiyal enfeksiyonların en sık görülen ve en mortal

seyreden tablolarından birisidir ve *K. pneumoniae*'nin HKP'lerin %11,8'inden sorumlu olduğu bildirilmiştir (50). Asya'da bir çalışma, mekanik ventilasyon gerektiren TKP'lerin en sık etyolojik ajanı olarak *K. pneumoniae*'yi işaret etmekte ve başka bir çalışma, hastanede yatan hastalarda %55'lik bir ölüm oranı öngörmektedir (51).

Hasta popülasyonuna bağlı olmakla birlikte cKp suşları, *E. coli*'den sonra İYE'lerin ikinci veya üçüncü en sık etkenidir (52). Tipik olarak, *K. pneumoniae* hastane kaynaklı İYE'lerin %2 ila 6'sından ve toplum kaynaklı İYE'lerin %4,3 ila 7'sinden sorumludur (53,54).

Pnömoni ve İYE ile *K. pneumoniae* kana yayılarak bakteriyemiye neden olabilir (55). Gram negatif patojenler arasında *K. pneumoniae* hem toplum hem de hastane kaynaklı bakteriyemilerin etkeni olarak *E. coli*'den sonra ikinci sırada bulunmaktadır (2). *K. pneumoniae* bakteriyemileri yüksek ölüm oranına sahiptir ve *K. pneumoniae* bakteriyemisini takiben mortalite, bakteriyeminin kaynağı ve konağın durumuna göre değişmekle birlikte %20'lere kadar çıkmaktadır (55).

2.1.5. Tedavi

K. pneumoniae ampisilin, amoksisilin ve tikarsilin gibi beta-laktam ajanlara karşı kromozomal dirence sahiptir, dolayısıyla bu ajanlar tedavide kullanılamaz (6). Bununla birlikte *K. pneumoniae*'da kazanılmış direnç de siktir ve yıllar geçtikçe tedavisi zor bir bakteri haline almıştır. Şubat 2017'de, yeni antibiyotiklerle ilgili araştırma ve geliştirmeye odaklanmak ve rehberlik etmek amacıyla DSÖ, yeni antimikrobiyal geliştirmeye acilen ihtiyaç duyulan patojenleri belirlemiştir. Bu geniş liste içerisinde ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) patojenleri öncelikli statü olarak belirlenmiştir (5).

GSBL'ler, çoğu penisilin ve sefalosporinleri ve aztreonamı inaktive eden enzimlerdir, ancak GSBL üreten suşlar genellikle karbapenemlere duyarlıdır. GSBL'ler siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazol, gentamisin gibi beta-laktam grubu olmayan ajanları ise inaktive etmezler. Bununla birlikte, GSBL genlerini taşıyan organizmalar, genellikle geniş bir antibiyotik yelpazesine karşı direnç sağlayan ek genler veya mutasyonlara sahip olabilir. Herhangi bir gram negatif organizma, GSBL genlerini

barındırma potansiyeline sahiptir, ancak bu durum en çok *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Proteus mirabilis*'te yaygındır (56).

GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin sebep olduğu komplike olmayan sistit tedavisinde nitrofurantoin ve trimetoprim-sülfametoksazol güvenli ve etkili ajanlardır. Buna ek olarak karbapenemler ve siprofloksasin ve levofloksasin gibi kinolonlar da aynı amaçla kullanılabilir. Amoksisilin-klavulanat ve tek doz aminoglikozid ise komplike olmayan sistit için alternatif tedavi seçenekleridir. Piperasilin-tazobaktam, komplike olmayan sistit tedavisinde ampirik tedavi olarak başlanırsa ve etken daha sonra GSBL üreten *K. pneumoniae* olarak tanımlanırsa klinik yanıt alınması halinde antibiyoterapinin devamı önerilmektedir. Sefepim de aynı durumda klinik yanıt alınması halinde komplike olmamış sistitlerin tedavisinde kullanılabilir (56).

GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin sebep olduğu pyelonefrit ve komplike İYE'de siprofloksasin, levofloksasin ve trimetoprim-sülfametoksazol tercih edilebilir. Karbapenemler ampirik başlanabilir, yukarıdaki ajanlar duyarlı bulunması halinde de-escalasyon yapılması önerilir. Aminoglikozidler nefrotoksisite riski değerlendirildikten sonra alternatif olarak kullanılabilir (56).

Üriner sistem dışındaki GSBL üreten *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının birinci basamak tedavisinde karbapenem grubu bir antibiyotik önerilmektedir. Uygun klinik yanıt alındıktan sonra tedavinin devamı oral trimetoprim-sülfametoksazol veya kinolonlarla sürdürülebilir (56).

K. pneumoniae'nin tedavisi GSBL üretiminin yanı sıra karbapenem direncinden dolayı da zorlaşmaktadır. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* (KdKp), en az bir karbapenem grubu antibiyotiğe dirençli veya karbapenemaz enzimi üreten suşları tanımlar ve tedavilerinde daha geniş spektrumlu ajanlar kullanılması gerekmektedir (56).

KdKp'ye bağlı komplike olmamış sistit tedavisinde nitrofurantoin, trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin, levofloksasin ve tez doz aminoglikozid seçenekleri idrarda yüksek konsantrasyona sahip olan bu ilaçların tedavide etkin olmalarını sağlamaktadır. Meropenem duyarlı ise standart dozda tedavi uygulanabilir. Bu ajanlardan hiçbiri duyarlı değilse, seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem-silastatin-relebaktam ve sefiderokol komplike olmayan KdKp sistiti için kullanılması önerilen ajanlardır. Kolistin ise başka hiçbir duyarlı antibiyotik duyarlılığı olmayan hastalarda son seçenek olarak düşünülmelidir (56).

KdKp'ye bağı pyelonefrit veya komplike İYE'de trimetoprim-sülfametoksazol, siprofloksasin ve levofloksasin kullanımı önerilmektedir. İzolat ertapeneme dirençli, meropeneme duyarlı ise meropenemin yüksek doz uzamış infüzyonuyla tedavisi mümkün olabilir. Seftazidim-avibaktam, meropenem-vaborbaktam, imipenem silastatin-relebaktam ve sefiderokol alternatif olarak kullanılabilir. Aminoglikozidler nefrotoksisite göz önünde bulundurularak tedavide düşünülebilir (56).

Üriner sistem dışındaki KdKp enfeksiyonlarında meropeneme duyarlı kalan suşlar yüksek doz uzamış infüzyonla tedavi edilebilir. Karbapenemaz genine göre önerilen tedaviler değişiklik gösterir. Seftazidim-avibaktam KPC ve OXA-48 enzimi üreten KdKp tedavisinde başarı sağlar. Meropenem-vaborbaktam ve imipenem-silastatin-relebaktam, KPC enzimi üreten suşların çoğuna karşı etkindir, ancak OXA-48'e sahip olan suşlarda kullanımları önerilmemektedir. Metallo-beta-laktamazlar için seftazidim-avibaktam ve aztreonam kombinasyonu etkilidir. Sefiderokolün en sık görülen 5 karbapenemaz genine (KPC, NDM, VIM, IMP, OXA-48) sahip suşların hepsine karşı etkinliği yüksektir. Tigesiklin KdKp enfeksiyonlarında yüksek doz kullanılarak etkinlik sağlayabilir, eravasiklin alternatif olarak düşünülebilir, her iki ajanın da idrar ve serumda konsantrasyonu düşük kaldığından dolayı İYE ve kan dolaşımı enfeksiyonlarında kullanımı önerilmemektedir (56).

2.2. Karbapenemler

Karbapenemler; penisilinler, sefalosporinler ve aztreonamın da içinde bulunduğu beta-laktam grubu antibiyotiklerdendir, ancak kimyasal yapıları bakımından grubun diğer üyelerinden farklılık gösterirler. 70 yılı aşkın bir süredir, beta-laktam antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır (57). Bununla birlikte kullanıma girmelerinden kısa bir süre sonra, beta-laktam halkasını hidrolize eden ve ilaçları etkisiz hale getiren beta-laktamaz enzimlerinin ortaya çıkması ve yaygınlaşmasıyla yeni antibiyotiklere ihtiyaç artmıştır. Bu amaçla 1976'da *Streptomyces cattleya*'dan tienamisin adlı ilk karbapenem üretilmiştir (58). Kimyasal kararsızlığı nedeniyle, tienamisin terapötik bir ajan olarak kullanıma girememiştir, ancak beta-laktam halkasında yapılan değişikliklerle kararlı hale getirilmiş ve sonucunda klinik kullanıma ilk giren karbapenem olan imipenem geliştirilmiştir. 1985'te Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanmasından sonra, 1996'da meropenem, 2001'de

ertapenem, 2007'de doripenem de FDA onayı almıştır ve karbapenemler tüm dünyada kullanılmaya başlanmıştır. 2001'de biapenem, 2009'da ise oral kullanılabilen tebipenem Japonya'da klinik kullanıma girmiştir (57).

Penisilin, sefalosporin ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonlarıyla kıyaslandığında karbapenemlerin daha geniş spektruma sahip olduğu gösterilmiştir (59). Karbapenemlerin hemen hemen tamamı düşük oral biyoyararlanımlarına sahiptir ve gastrointestinal membranları kolayca geçemedikleri için intravenöz olarak kullanılmalıdır. İmipenem-silastatin ve ertapenem intramusküler de uygulanabilir. Tüm karbapenemler böbrekten atılırlar (60).

Karbapenemler, bakteri hücre duvarına kolayca difüze olmazlar, gram negatif bakterilere dış membran proteinleri üzerinden girerler. Periplazmik aralığa ulaştıklarında bakterilerin hücre duvarında peptidoglikan oluşumunu katalize eden penisilin bağlayan proteinleri (PBP) kalıcı olarak açillerler. Sonuç olarak peptitlerin çapraz bağlanmasını ve diğer peptidaz reaksiyonlarını inhibe ederler. Hücre duvarı oluşumu, oluşum ve otolizin aynı anda meydana geldiği dinamik bir üç boyutlu süreçtir, PBP'ler inhibe edildiğinde denge otoliz yönüne kayar. Sonuçta peptidoglikan tabakanın zayıflaması ile hücre duvarı bütünlüğü bozulur ve bakteri ozmotik basınç etkisine karşı koyamaz ve bu durum bakterinin ölümüyle sonuçlanır. Karbapenemlerin etkinliğinin önemli bir özelliği çok sayıda farklı PBP'ye bağlanabilme yeteneğidir. Karbapenemler genel olarak gram negatif bakterilerde PBP 2'ye güçlü bir şekilde bağlanır, ancak aynı zamanda PBP 1a, 1b ve 3'e de bağlanabilir (57).

2.2.1. Ertapenem

Diğer karbapenemler gibi ertapenem de çok sayıda gram pozitif ve gram negatif aerobik ve anaerobik bakteriye karşı etkinliği olan geniş spektrumlu bir beta-laktamdır. Komplike İYE, komplike intraabdominal enfeksiyon, komplike deri ve deri ekleri enfeksiyonları, toplum kökenli pnömoni ve akut pelvik enfeksiyonlarda kullanımı önerilmektedir. Ertapenem GSBL üreten gram negatif bakteri enfeksiyonlarına karşı etkili olarak kabul görmektedir. Aynı zamanda, yüksek ampisilinaz C (AmpC) beta-laktamaz seviyelerine sahip olan izolatlarda her ne kadar minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri yükselse de etkinliğini sürdürmektedir. Ancak

ertapenemin *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. maltophilia*, *B. cepacia*, enterokoklar ve metisiline dirençli stafilokoklarda kullanımı önerilmemektedir (59,61).

Ertapenemin proteinlere bağlanma oranı yaklaşık %94'tür. Yaklaşık 4 saatlik bir yarı ömrü olması sebebiyle günde bir kez kullanılması avantaj yaratmaktadır. Yetişkinlerdeki kullanım dozu günde 1 gramdır. P-glikoprotein veya sitokrom P450 aracılı ilaç klirensini inhibe etmediğinden ilaç etkileşimi nadirdir. En yaygın yan etkileri ishal, bulantı, kusma, baş ağrısı, tromboflebit, vajinit, aminotransferaz yüksekliğidir. Nadiren nöbete neden olabilir (61).

2.2.2. Meropenem

Meropenem için sınır değerler belirleyen kuruluşlar menenjit tedavisini meropenem ile sınırlamak dışında henüz enfeksiyon bölgesini dikkate almamaktadır (60). Meropenem konsantrasyonları akciğerde oldukça değişkenlik göstermektedir. Meropenemin akciğerdeki konsantrasyonu serumdakinin %9 ila %70,1'i arasında değişkenlik gösterebilir ve ortalama %25,4'üne karşılık gelmektedir (62). Pnömoni için optimal tedavi seçilirken meropenemin akciğerlere nispeten zayıf penetrasyonu düşünülmelidir (60). 1 gram meropenemin 8 saatte bir 3 saatlik infüzyonla verilmesi MİK'i 4 mg/l'ye kadar olan bakteriler için etkiliyken, infüzyonun 4 saate çıkarılması MİK'i 8 mg/l olan suşlarda da etkinlik sağlamaktadır (63-65). Her 8 saatte bir 2 gram meropenemin 4 saatlik infüzyonları, 16 mg/l'ye kadar MİK'leri olan organizmalar için yeterli olabilmektedir (63). Aralıklı infüzyonlar için (30 dakikalık infüzyon), 6 saatte bir 500 mg, MİK değeri \leq 1-4 mg/l olan organizmalar için yeterli maruziyet sağlarken, 8 saatte bir 1 gram maruziyet, MİK değeri \leq 1-2 mg/l olan organizmalar için yeterli maruziyet sağlar (63,66).

Meropenemin yarı ömrü, kreatinin klerensi >30 ml/dk olan hastalarda 0,94-2,5 saat aralığında olup doğrudan böbrek fonksiyonu ile ilişkilidir (60). Karın ağrısı, baş ağrısı, ishal, kusma, döküntü gibi yan etkiler görülebilir (67).

2.2.3. İmipenem

İmipenem, polimikrobiyal sepsiste tercih edilen bir ajandır (59). 7 günden uzun süreli nötropenisi olan hastalarda imipenemin sefepimden daha etkili olduğu

gösterilmiştir (68). İmipeneme duyarlı olmayan çoklu ilaca dirençli *A. baumannii* enfeksiyonlarında imipenem ve kolistin kombinasyonunun aktivitesini değerlendiren *in vitro* bir çalışmada imipenem direncinin önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Kolistinin tek başına kullanıldığında heterorezistans gelişimini ve kolistinin nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi ciddi yan etkilerini azaltmak için imipenem, kolistin ile kombine bir şekilde kullanılabilir (69). İmipenemin *Proteus*, *Providencia* ve *Morganella* türlerinin içinde bulunduğu *Morganellaceae* ailesine karşı MİK değerlerinin yüksek olduğu bilinmektedir (70).

Yarı ömrü 1 ila 3 saat arasında değişir (60). Dokulara ve vücut sıvılarına yaygın olarak dağılır. Dehidropeptidaz-1 (DHP-1) enzimi tarafından metabolize edildiğinden etkinliğinin sürdürülebilmesi için silastatin ile birlikte verilmelidir (57,59). Yan etki olarak ishal, kusma ve döküntü görülebilir (67).

2.2.4. Doripenem

Gram pozitif bakterilerde imipeneme ve gram negatif bakterilerde meropeneme benzer etkinlik gösterir. Genel olarak meropenemden daha güçlüdür. Gram negatif bakterilere karşı doripenemin aktivitesi meropenem ile benzerdir ancak imipenemden daha üstündür. Doripenem komplike İYE, intraabdominal enfeksiyonlar için FDA onayı almıştır, Avrupa'da ayrıca ventilatör ilişkili pnömoni (VİP) dahil hastane kaynaklı pnömoni tedavisi için lisanslıdır (71). Doripenemin imipeneme kıyasla VİP tedavisinde hastanede kalış süresini daha kısa tuttuğu gösterilmiştir (72). 2011 yılında doripenem, Japonya'da pnömoni tedavisinde yüksek dozlarda (günde 3 g) verilmek üzere onaylanmıştır ve yüksek doz doripenemin etkili ve nispeten güvenli olduğu gösterilmiştir (73). Doripenemin *in vitro* etkinliğini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, doripenemin *E. coli*, *Acinetobacter* spp. ve *P. aeruginosa*'ya karşı meropenem ile aynı güce sahip olduğu gösterilmiştir. Doripenemin imipeneme kıyasla *E. coli*'ye karşı en az iki kat daha potent olduğu ve daha fazla sayıda *P. aeruginosa* suşunun üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir (71). *Enterobacteriaceae*'ya karşı doripenemin etkinliği meropeneme benzer veya daha yüksek, imipenemden ise 4 kat daha yüksektir. Doripenem, *P. aeruginosa*'ya karşı imipenem ve meropenemden daha etkindir (74). Karbapeneme dirençli *E. coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *K. pneumoniae*'da doripenemin de içinde

bulduğu kombinasyonların *in vitro* %90 bakterisidal aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir (75).

Yarı ömrü yaklaşık 1 saattir (60). En sık görülen yan etkileri arasında baş ağrısı, ishal, bulantı, döküntü ve flebit yer almaktadır (76).

2.3. *K. pneumoniae*'da Karbapenem Direnci

K. pneumoniae'da karbapenem direnci çeşitli mekanizmalar üzerinden gerçekleşebilmektedir. Dirençten en sık karbapenemaz üretimi sorumludur, bunun haricinde porin kaybı veya azalması, efluks pompaları ve GSBL/AmpC üretiminin diğer direnç mekanizmalarıyla kombinasyonu da direnç oluşumunda etkili mekanizmalardır (77).

2.3.1. Karbapenemazlar

Karbapenemler, beta-laktam grubu antibiyotikler içinde en geniş spektruma sahip antibiyotiklerdir. Karbapenemazlar ise karbapenemlerin yanı sıra diğer birçok beta-laktam yapısına sahip antibiyotiği hidrolize edebilirler. Karbapenemaz aktivitesiyle sefalosporinler ve/veya penisilinler karbapenemlerden daha verimli parçalanabilir (78).

Beta-laktamazların sınıflandırması ilk kez 1968 yılında Sawai ve ark. tarafından yapılmıştır (79). Bunu 1970 yılında Jack ve Richmond'ın sınıflandırması takip etmiş ve 1973'te Richmond ve Sykes yeni bir sınıflandırma daha oluşturmuştur (80). Enzim sayısının ve çeşitliliğinin artması yeni sınıflamaları beraberinde getirmiştir. 1980'de Ambler, beta-laktamazları aminoasit özelliklerine göre 4 sınıfa ayırdığı moleküler bir sınıflama geliştirmiştir (81). 1995'te Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından beta-laktamazların fonksiyonel özelliklerini içeren ve moleküler sınıflama ile karşılaştırması olan bir sınıflandırma yapılmıştır. 2009 yılında Bush ve Jacoby önceki sınıflandırmalarını geliştirerek günümüzde en sık kullanılan sınıflandırmalardan birini oluşturmuştur. Karbapenemazlar, Ambler sınıflamasında sınıf A, B ve D'de yer alırken, Bush-Jacoby sınıflamasında 2df, 2f, 3a ve 3b'de yer alırlar (82). Tablo 4'te Bush-Jacoby sınıflaması ve Ambler sınıflamasının karşılaştırılması gösterilmiştir.

Tablo 4. Bush-Jacoby ve Ambler Sınıflaması (82)

Bush-Jacoby Sınıflaması	Moleküler Sınıflama (Ambler)	Hedef Antibiyotik	KA veya TB ile İnhibisyon	EDTA ile İnhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Sefalosporinler	-	-	GC1, CMY-37
2a	A	Penisilinler	+	-	PC1
2b	A	Penisilinler, Dar Spektrumlu Sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Genişlemiş Spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	A	Penisilinler	-	-	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Genişlemiş Spektrumlu Sefalosporinler, Monobaktamlar	-	-	TEM-50
2c	A	Karbenisilin	+	-	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Karbenisilin, Sefepim	+	-	RTG-4
2d	D	Kloksasilin	Değişken	-	OXA-1, OXA-10
2de	D	Genişlemiş Spektrumlu Sefalosporinler	Değişken	-	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Değişken	-	OXA-23, OXA-48
2e	A	Genişlemiş Spektrumlu Sefalosporinler	+	-	CepA
2f	A	Karbapenemler	Değişken	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B (B1)	Karbapenemler	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
	B (B3)				L1, CAU-1, GOB1, FEZ-1
3b	B (B2)	Karbapenemler	-	+	CphA, Sfh-1

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit, KA: Klavulanik Asit, TB: Tazobaktam

2.3.1.1. Sınıf A Karbapenemazlar

Bush-Jacoby sınıflamasında grup 2f'de yer alan bu karbapenemazlar 30 yıldan uzun süre önce keşfedilmişlerdir. Bu beta-laktamazlar *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* ve *Klebsiella* spp.'de tek izolatta veya küçük salgınlar halinde gözlenmişlerdir. Sınıf A'da KPC, GES, NMC/IMI, SME olmak üzere 4 ana karbapenemaz ailesi yer almaktadır. Hepsisi, penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve aztreonam dahil olmak üzere çok çeşitli beta-laktamları hidrolize etme yeteneğine sahiptir (83).

Klebsiella pneumoniae karbapenemase (KPC) enzimleri plazmidlerde kodlanır. KPC ağırlıklı olarak *K. pneumoniae*'da bulunur ancak *Enterobacter* spp. ve *Salmonella* spp.'de de KPC varlığı gösterilmiştir (84). KPC ilk olarak 1996 yılında Kuzey Carolina'dan bir *K. pneumoniae* klinik izolatında tespit edilmiştir ve bu enzim KPC-1 olarak isimlendirilmiştir. Bu izolat, test edilen tüm beta-laktamlara dirençli bulunmuş ancak klavulanat ile karbapenem MİK'lerinde azalma saptanmıştır (83). KPC-1'deki nokta mutasyon sonucu oluşan KPC-2, 2003 yılında ABD'de 4 izolatta tanımlanmıştır. Bu izolatlar, imipeneme duyarlılıkları azalsa da Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) kriterlerine göre dirençli saptanmamıştır (85). KPC-2'nin tek aminoasit varyantı olan KPC-3, New York'ta 2000-2001 yılları arasındaki bir *K. pneumoniae* salgınında rapor edilmiştir. 2006'de ilk kez *P. aeruginosa*'da KPC-2 tespit edilmiştir ve *Enterobacteriaceae* dışında da karbapenemazların yayılımının ciddiyeti artmıştır. ABD'de KPC sınıfı karbapenemazların hızla yayılmasından sonra dünyada da KPC içeren suşlar gözlenmeye başlanmıştır. ABD harici ilk KPC üreten suşlar 2004'te Çin'de, 2005'te Fransa, Kolombiya ve İsrail'de izole edilmiştir (83). Günümüzde 100'ün üzerinde KPC varyantı tanımlanmıştır (86).

KPC; nitrosefin, sefalotin, sefaloridin, benzilpenisilin, ampisilin ve piperasilini etkin biçimde hidroliz etme yeteneğine sahip olmakla birlikte beta-laktam grubu antibiyotiklerin tüm sınıflarına karşı etkinlik göstermektedir. İmipenem, meropenem, sefotaksim ve aztreonam, penisilinler ve dar spektrumlu sefalosporinlerden on kat daha az biçimde bu enzimden etkilenir. Sefoksitin ve seftazidimde zayıf ancak ölçülebilir hidroliz gözlenir. Diğer mekanizmaların yokluğunda, KPC'ye sahip suşlar, karbapenemlere duyarlılıkları azalmakla birlikte direnç göstermeyebilir ve bazı fenotipik testler, KPC'ye sahip bu izolatları GSBL üreten suşlar olarak yanlış tanımlayabilir (83).

KPC plazmidler üzerinde aktarıldığından ve *K. pneumoniae* gibi yaygın görülen bir patojende sıklıkla bulunduğundan dolayı büyük bir yayılma potansiyeline sahiptir. Ek olarak çeşitli salgınlarda görülen klonal yayılma bu enfeksiyon için enfeksiyon kontrolünde zorluk yaratmaktadır. KPC'ye sahip izolatların çoklu ilaca dirençli olma potansiyeli ve yüksek mortaliteyle ilişkili olmaları akılda tutulmalıdır (87).

Guiana Extended Spectrum (GES) enzimi ilk kez 1998 yılında Fransa'da, daha önce Fransız Guyanası'nda hastanede yatış öyküsü olan bir bebekten izole edilen *K. pneumoniae*'da gözlenmiştir ve bu enzim GES-1 olarak adlandırılmıştır (88).

GES enzimlerini kodlayan genler plazmidlerdeki integronlarda bulunmaktadır. GES, penisilinleri ve geniş spektrumlu sefalosporinleri içeren geniş bir hidroliz spektrumuna sahip olduğundan başlangıçta GSBL olarak değerlendirilmiştir. GES-1'in karbapenemaz aktivitesi düşüktür, fenotipik olarak GSBL üreten izolatlarla sıklıkla karışabilmektedir. 2001 yılında GES-2 içeren bir *P. aeruginosa*'nın imipenemi hidrolize ettiği gözlenmiştir. GES-2, GES-1'e göre imipenemi 100 kat daha iyi hidrolize etmesiyle önem kazanmıştır. GES-2, GES-4, GES-5 ve GES-6, GES-1'den farklı olarak imipenem hidrolizi ile ilişkili varyantlardır. Nadir olmasına rağmen Yunanistan, Fransa, Portekiz, Güney Afrika, Fransız Guyanası, Brezilya, Arjantin, Kore ve Japonya'dan gelen raporlarla GES enzimleri dünya çapında tanımlanmıştır (83).

2.3.1.2. Sınıf B Karbapenemazlar

Sınıf B karbapenemazlar metallo-beta-laktamaz (MBL) olarak da adlandırılır ve geniş bir beta-laktam hidroliz spektrumuna sahiptir. Aztreonam hariç hemen hemen tüm beta-laktam antibiyotikleri hedef alabilir. Klavulanat, sülbaktam veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine karşı dayanıklı olmalarıyla sınıf A karbapenemazlardan ayrılırlar. Ayrıca serin bazlı sınıf A, C ve D'de yer alan enzimlerin aksine, MBL'ler EDTA gibi metal şelatörler tarafından inaktive edilir. Hidroliz yeteneği enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonları ile beta-laktamların etkileşimine bağlıdır (89).

Bulunan ilk MBL'ler *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. ve *Stenotrophomonas maltophilia* gibi patojenlerin kromozomal enzimleridir. Bu kromozomal enzimler genellikle en az bir serin beta-laktamaz eksprese eden bakterilerde bulunur ve her iki beta-laktamaz da beta-laktamlara maruz kaldıktan sonra indüklenebilir. Hem kromozomal

genlerin kolayca aktarılamaması hem de bu genlerin *S. maltophilia* hariç genelde fırsatçı patojenlerde bulunması ciddi hastane enfeksiyonlarına sebep olmasını engellemiştir (83).

Kromozomal MBL'lerin aksine 1990'lı yıllarda *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* gibi gram negatif bakterilerde Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase (VIM) ve Imipenemase (IMP) gibi kazanılmış ve plazmid aracılı aktarılabılır MBL'lerin saptanması ve yayılmasında ciddi bir artış olmuştur (89). Aktarılabılır imipenem direnci ilk olarak Japonya'da 1990 yılında bir *P. aeruginosa* izolatında tespit edilmiş, ardından *Bacillus fragilis*'te aktarılabılır bir karbapenemaz bulunmuştur. Aktarılabılır *B. fragilis* enzimi Japonya'da yaygın klinik salgınlara neden olmamıştır. Buna karşılık, *P. aeruginosa*'da bulunan IMP-1, Japonya'da *Serratia marcescens* ve diğer *Enterobacteriaceae*'larda da gözlenmiştir (83).

İntegronla ilişkili MBL'lerin bir başka yaygın ailesi VIM enzimlerinden oluşur. VIM-1 ilk olarak 1997'de İtalya'nın Verona kentinde izole edilmiştir. Bunu 1996'da Fransa'da bulunan ancak sonradan raporlanan VIM-2 geni takip etmiştir. Bu enzimlerin her ikisi de başlangıçta *P. aeruginosa* klinik izolatlarında bulunmuştur. 2006 yılına kadar İtalya ve Yunanistan'da VIM üreten *P. aeruginosa*'nın büyük salgınları ve ardından VIM üreten *K. pneumoniae* salgınları ile birlikte VIM Güney Avrupa'ya yayılmıştır. VIM-2, diğer VIM varyantlarına kıyasla dünya genelinde daha çok yayılma fırsatı bulmuştur (83). 2008 yılına kadar Yunanistan'daki karbapenemaz üretimi esas olarak VIM kaynaklı olmuştur. Günümüzde VIM, başlıca *K. pneumoniae* ve *E. cloacae* komplekste bulunmaktadır. IMP'lerden daha sık tanımlanmalarına rağmen, karbapenem dirençli patojenlerdeki tüm karbapenemazların azınlığını temsil ederler (90).

Günümüzde *Enterobacterales* ve *A. baumannii*'de en yaygın MBL olan NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase), ilk olarak 2008'de Hindistan'ın Yeni Delhi kentinden İsveç'e seyahat eden bir hastadan izole edilen *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında tanımlanmıştır (91). 2012'den 2014'e kadar içinde Türkiye'nin de bulunduğu 40 ülkeden toplanan 46.000'den fazla *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa* izolatlarının dahil edildiği bir sürveyans çalışmasında NDM tipi enzimlerin MBL üreten *Enterobacteriaceae*'nin %44,2'sinden sorumlu olduğu gösterilmiştir (92). Hindistan'dan gelen klinik izolatların retrospektif analizleri NDM-1'in 2006'da var olduğunu ortaya koymuştur. Birkaç yıl içinde NDM, Hindistan ve Pakistan'ın tüm bölgelerine özgü hale gelmiş ve Kuzey Avrupa'ya yayılmaya başlamıştır. İlk kez tanımlanmalarının ardından

on yıldan kısa bir süre geçmesine rağmen, NDM-1 tüm dünyaya yayılmış ve birçok *Enterobacteriaceae*'da, gıda kaynaklı patojenler olan *Shigella* spp. ve *Vibrio cholerae*'da ve *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir (90). NDM-1'i eksprese eden izolatlar genellikle çoklu ilaca dirençlidir. NDM-1'in, plazomisin dahil aminoglikozidlere dirence yol açan ArmA, RmtB veya RmtC 16S ribozomal ribonükleik asit (rRNA) metilazlar ile birlikteliği dikkat çekmektedir (93). NDM üreten *Enterobacteriaceae*'nın neden olduğu salgınlar Yunanistan, Meksika ve Hollanda'daki hastanelerde ve Çin'deki bir yenidoğan ünitesinden bildirilmiştir (90).

2.3.1.3. Sınıf D Karbapenemazlar

Sınıf D karbapenemazlar, *A. baumannii* ve *Enterobacterales*'te karbapenem direncinin önemli enzimleri olan oksasilinaz (OXA) enzimlerini içerir. Bu enzimler özellikle aminopenisilin, karboksipenisilin ve üreidopenisilinler olmak üzere genel olarak penisilinlere ve sefalotin gibi dar spektrumlu sefalosporinlere karşı iyi etkinlik gösterirler. Seftazidim, seftriakson, sefepim gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere, karbapenemlere karşı hidroliz yetenekleri düşüktür (94).

Filogenetik olarak iki gruba ayrılırlar. Grup 1 esas olarak *A. baumannii*'de bulunur ve 4 alt grup içerir. 1a alt grubu OXA-23 benzeri beta-laktamazlar olarak adlandırılır ve OXA-23'ün yanı sıra, OXA-27, -49, -73, -102, -103, -133, -146, -165, -166, -167, -168, -169, -170, -171, -225, -239, -366, -398, -422, -423, -435, -440, -481, -482, -483, -565'i içerir. 1b alt grubu OXA-24/40 benzeri beta-laktamazlardır ve OXA-24, -25, -26, -72, -139, -160, -207, -437'yi içerir. 1c alt grubunda OXA-51 benzeri beta-laktamazlar yer alır. 1d alt grubunda ise OXA-58 benzeri beta-laktamazlar bulunur, OXA-96, -97, -164, -397, -420, -512 grubun diğer üyeleridir (94).

Grup 2, OXA-48 ile ilişkili karbapenemazlardan oluşur. OXA-48 benzeri enzimler, diğer D sınıfı beta-laktamazlarla zayıf bir şekilde ilişkilidir ve diğer OXA üyeleriyle %50'den az amino asit benzerliği gösterir. Kazanılmış OXA-48 tipi karbapenemazlar, *Enterobacterales* arasında karbapenemlere karşı azalmış duyarlılığın önemli nedenleridir. Grup 2'de OXA-48'in dışında OXA-162, -181, -204, -232, -244, -245, -247, -370, -436, -484, -519 gibi enzimler yer almaktadır (94). OXA-48 benzeri enzimler olmalarına rağmen OXA-163, OXA-252, OXA-405 yeterli karbapenemaz aktivitesine sahip değildir (95). Sırasıyla OXA-48, OXA-181, OXA-232, OXA-204,

OXA-162 ve OXA-244, OXA-48 benzeri karbapenemazlar arasında en yaygın görülen enzimlerdir (94).

Genel olarak OXA-48 benzeri enzimlerin karbapenemaz yetenekleri düşüktür ve yüksek düzeyde karbapenem direnci sağlamak için GSBL'ler ve/veya porin mutasyonları ile birlikte bulunmaları gereklidir (96). Bununla birlikte OXA-48'in imipenemi hidroliz etmedeki etkinliği, *Acinetobacter* spp.'de sıklıkla görülen OXA-23 benzeri enzimlerden yaklaşık 10 kat daha yüksektir (94).

OXA-48, ilk olarak 2001 yılında İstanbul'da 54 yaşındaki bir erkek hastada *K. pneumoniae*'ya bağlı İYE'de tanımlanmıştır. Bu suş, meropenem ve imipenem dahil test edilen tüm beta-laktamlara ve aminoglikozidler, kloramfenikol, nalidiksik asit, siprofloksasin, sülfonamidler ve tetrasikline karşı dirençli saptanmıştır. Suşun toplamda 5 farklı beta-laktamaz ürettiği tespit edilmiştir (97). Türkiye dışında OXA-48'in ilk raporu, 2008 yılında Belçika'nın Brüksel kentinde, lenfoma kemoterapisi gören bir hastada *K. pneumoniae*'ya bağlı İYE'de bildirilmiştir. Daha sonra 2010 yılında *E. coli*, *E. cloacae*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii* gibi *Enterobacterales* üyelerinde de Lübnan, Mısır, Fransa, Tunus ve Fas'tan OXA-48 bildirilmiştir. 2011'de İsrail, Senegal, Hollanda, İspanya, İrlanda ve Slovenya'dan OXA-48 üreten *Enterobacterales* bildirilmiştir. Fransa, Belçika, İrlanda ve İspanya'da ilk OXA-48 üreten suşların bildiriminden hemen sonra hastane salgınları meydana gelmiştir. OXA-48 üreten *Enterobacterales* şu anda Türkiye'de, Lübnan, Ürdün, Umman, İran ve Suudi Arabistan gibi Orta Doğu ülkelerinde ve Fas, Cezayir, Tunus ve Mısır gibi Kuzey Afrika ülkelerinde endemiktir ve hastane kaynaklı salgınlara sebep olmaktadır. Günümüzde OXA-48, Antarktika kıtası hariç tüm kıtalarda yayılıma sahip olmuştur (94).

OXA-181 en yaygın görülen ikinci OXA-48 benzeri enzimdir ve ilk olarak 2006-2007 yıllarında Hindistan'da sürveyans programında 10 *K. pneumoniae* ve 1 *E. cloacae* komplekste raporlanmıştır (98). Daha sonra 2011'de Fransa, Hollanda, Umman ve Yeni Zelanda'da *C. freundii* ve *K. pneumoniae* suşlarında gösterilmiştir (94). Günümüzde OXA-181 üreten *Enterobacterales* Güney Hindistan'da endemiktir ve hastane kaynaklı salgınlara önemli nedenleri arasındadır (99).

OXA-181 ilk olarak bir *K. pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. *K. pneumoniae* OXA-181 üretiminin en sık görüldüğü bakteridir. *E. coli*, *C. freundii*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* de OXA-181 ürettiği gözlenen diğer *Enterobacterales*

üyeleridir. Ayrıca *Aeromonas caviae* ve *P. aeruginosa*'nın da OXA-181'e sahip suşları bildirilmiştir (94).

OXA-232 şu anda en yaygın üçüncü OXA-48 benzeri enzimdir ve 2013 yılında Hindistan'a yakın zamanda seyahat öyküsü olan 3 Fransız hastadan alınan rektal sürüntülerde saptanmıştır. İzolatlardan 1'i *E. coli*, 2'si *K. pneumoniae* olarak bildirilmiştir (100). 2014-2015 yıllarında ABD, Malezya, Güney Kore ve Meksika'da OXA-232 rapor edilmiş olup bu suşların çoğunun aynı zamanda NDM-1 ürettiği ve hastaların Hindistan alt kıtasına seyahat öyküsü bulunduğu bildirilmiştir. 2015'ten sonra Avrupa'da Almanya ve İngiltere olmak üzere çeşitli ülkeler, Asya'da Çin ve Tayland, Afrika'da Tunus gibi ülkelerden de OXA-232 raporlanmıştır. OXA-232 üreten *Enterobacterales* Hindistan'da endemik kabul edilmektedir. Bildirilen suşlar göz önüne alındığında bu enzimin en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da üretildiği gözlenmektedir (94).

OXA-204 nadiren bildirilen bir OXA-48 benzeri karbapenemazdır ve ilk olarak 2013 yılında Tunus'ta idrar kültüründe üreyen ertapenem azalmış duyarlılığa sahip *K. pneumoniae*'da tespit edilmiştir. İzolat meropenem ve imipenem duyarlı olmakla birlikte penisilinlere, beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarına ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı dirençli saptanmıştır (101).

OXA-162 ilk defa 2008 yılında Türkiye'de *K. pneumoniae*'da tanımlanan nadir görülen bir karbapenemazdır. 2012'den beri Türkiye, Macaristan ve Yunanistan'dan *K. pneumoniae*'da bildirimler yapılmıştır (94).

OXA-244, ilk defa 2011'de İspanya'dan *K. pneumoniae*'da bildirilmiş nadir görülen bir OXA-48 benzeri enzimdir. Almanya, Rusya, Fransa, Hollanda, İngiltere OXA-244'ü bildiren diğer ülkelerdir. *K. pneumoniae*'nın yanı sıra *E. coli* ve *Klebsiella aerogenes* OXA-244 üreten *Enterobacterales* olarak karşımıza çıkmaktadır (94).

2.3.2. Porin Kaybı/Azalması

K. pneumoniae'da porin kaybı veya azalmasının karbapenem direncine etkisi düşüktür. *K. pneumoniae*'nın dış membran proteinlerinden OmpK35 ve OmpK36'nın yapımında azalma karbapenem direncinden sorumlu olabilir. OmpK37'nin kaybı veya azalmasının *K. pneumoniae*'da karbapenem direncinde küçük bir rolü olduğu

kanıtlanmıştır. Aynı zamanda fosfat taşımada görevli bir porin olan phoE'nin yapımında azalma da karbapenem direncine yol açabilir (102).

2.3.3. Efluks Pompaları

K. pneumoniae'da bulunan KpnGH efluks pompa sisteminin ertapenem ve imipenem direncine sebep olduğu gösterilmiştir (103). Ayrıca AcrAB-TolC efluks pompasının aşırı ekspresyonu da karbapenem direncine sebep olmaktadır (104).

2.3.4. GSBL/AmpC Üretimi

GSBL veya AmpC üretiminin, porin kaybı veya azalması, efluks pompalarının aşırı ekspresyonu gibi diğer karbapenem direnç mekanizmalarıyla birlikte bulunması karbapenem direncine yol açabilir (77).

2.4. Karbapenemaz Tespit Yöntemleri

Karbapenemaz enzimlerin çeşitliliği ve yöntemlerin enzim tipine göre duyarlılık ve özgüllüklerindeki farklılıklar karbapenemaz tespitini zorlaştırmaktadır. Karbapenemaz tespit yönteminin seçimi epidemiyoloji, tanısal performans, iş gücü, sonuç alma süresi, karmaşıklık ve maliyet gibi faktörlere göre yapılmaktadır. Karbapenemaz üretimine bağlı karbapenem direncinin tespiti, hasta yönetimi, enfeksiyon kontrolü ve halk sağlığı için önemlidir (105).

Karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da karbapenem MİK değerleri klinik sınır değerlere göre duyarlı veya artmış dozda duyarlı kategorisinde kalabilir. Bu yüzden epidemiyolojik sınır değerler (ECOFF) karbapenemaz üretiminin saptanması için kullanılmalıdır. Karbapenemaz üretiminin saptanmasında ertapenem, GSBL veya AmpC üreten suşların porin kayıplarıyla birlikteliği sonucu oluşan karbapenem direncinden de etkilenebileceği için özgüllüğü düşük kalmakla birlikte duyarlılığı en iyi karbapenemdir. Duyarlılık ve özgüllük dengesi birlikte düşünüldüğünde meropenem tercih edilecek en iyi ajan olarak ön plana çıkmaktadır. Özgüllüğü artırmak için imipenem ve ertapenem için kullanılması belirlenen tarama eşik değerlerinin ECOFF'tan bir dilüsyon daha yüksek tutulması önerilmektedir. Rutin antibiyogramda karbapenem duyarlılığı tarama eşik

değerinin üzerinde kalan suşların karbapenemaz üretiminin doğrulanması gerekmektedir. Doğrulama için kullanılan testler fenotipik ve genotipik yöntemler olarak iki grupta toplanabilir (106). Tablo 5'te *Enterobacterales* için Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) önerilerine göre MİK veya disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan karbapenemaz taraması için eşik değerler gösterilmiştir.

Tablo 5. Karbapenemaz Üreten *Enterobacterales* İçin Klinik Sınır Değerler ve Tarama Eşik Değerleri (106)

Karbapenem	MİK (mg/L)		Disk Difüzyon Zon Çapı (mm) (10 µg)	
	Duyarlılık Klinik Sınır Değeri	Tarama Eşik Değeri	Duyarlılık Klinik Sınır Değeri	Tarama Eşik Değeri
Meropenem	≤2	>0.12	≥22	<25
Ertapenem	≤0.5	>0.12	≥25	<25

Not: Meropenem disk difüzyon zon çapı 25-27 mm olan suşlar piperasilin-tazobaktama ve/veya temosiline dirençli ise tarama pozitif kabul edilir.

2.4.1. Fenotipik Yöntemler

2.4.1.1. Modifiye Hodge Testi (MHT)

MHT, karbapenemaz tespiti için en kapsamlı şekilde tanımlanan testlerden biridir. Karbapeneme duyarlı *E. coli* American Type Culture Collection (ATCC) 25922 suşunun 0,5 McFarland bulanıklığındaki solüsyonu 10 kat dilüe edilir ve Mueller-Hinton agara (MHA) yoğun ekimi yapılır. 3-10 dakika plağın kuruması beklendikten sonra meropenem veya ertapenemin 10 µg'lık diskleri plağın ortasına konulur. Test edilecek suştan 3-5 koloni alınır ve diskin kenarından plağın dışına doğru çizgi şeklinde ekilir. Plak 35-37 °C'de 16-20 saatlik inkübasyona bırakılır. Karbapenem diskine bağlı oluşan inhibisyon zonunun test edilen izolatanın inokülasyon hattına doğru girinti yapması veya yonca yaprağı şeklinde bir görüntü oluşması testin pozitif olduğunu gösterir (107).

MHT, KPC başta olmak üzere çoğu karbapenemaz için için kabul edilebilir duyarlılık gösterir ancak MBL'ler için duyarlılığı düşük kalmaktadır. GSBL veya AmpC üretiminin porin kayıplarıyla kombinasyonuna sahip izolatlar yanlış pozitif sonuçlara yol açabilmektedir. Bu test ucuz maliyet, her laboratuvarında kolaylıkla bulunabilen materyaller gerektirmesi ve uygulama kolaylığı bakımından avantaj sağlamakla birlikte antibiyotik duyarlılık sonucu elde edildikten sonra fazladan bir gecelik inkübasyon süresine ihtiyaç duyulması, yorumlamanın göreceli veya zor olması, karbapenemaz türlerini tayin edememesi sebebiyle dezavantajlıdır. Bu sınırlamalar nedeniyle MHT, 2018'de CLSI M100 dokümanında önerilen karbapenemaz tespit yöntemi olmaktan çıkarılmıştır (108). EUCAST tarafından da özgüllük ve duyarlılığının yetersizliği, yorumlama zorluğu sebebiyle artık kullanımı önerilmemektedir (106).

2.4.1.2. Kombinasyon Disk Testi (KDT)

Karbapenemin tek başına ve karbapenem direncini ortadan kaldırmaya yönelik karbapenemaz inhibitörü ile kombine halde kullanılması esasına dayanır (108). Karbapenemaz inhibitörü olarak Ambler sınıf A ve sınıf C için boronik asit, sınıf B için EDTA veya dipikolinik asit (DPA) kullanılmaktadır. AmpC ile ilişkili karbapenem direncine yönelik kloksasilin inhibitör olarak teste eklenmektedir. OXA-48 avibaktam ile inhibe olmakla birlikte avibaktamın sınıf A ve sınıf C'ye karşı da inhibitör etkinliği olduğu bilinmektedir. OXA-48 benzeri enzimlere yönelik herhangi spesifik bir inhibitör bulunmamakla birlikte temosilin MİK değerinin >128 mg/L veya zon çapının <11 mm olması ve sınıf A, B ve C için spesifik inhibitörlerle sinerjinin saptanmaması OXA-48'e sahip suşların tespiti için önerilmektedir (106).

KDT için geliştirilmiş ticari kitler mevcuttur. Mastdiscs combi Carba Plus (MAST Diagnostics, İngiltere) ve KPC + MBL Confirm ID kit (Rosco Diagnostica, Danimarka) bu kitlere örnek olarak verilebilir. KDT, spesifik karbapenemazların tespiti için basit, ucuz ve doğruluğu yüksek bir testtir. Bununla birlikte karbapenemaz türünün belirlenmesindeki algoritma ve iş akışı zorlayıcı olabilmektedir (108). Tablo 6'da KDT ile karbapenem direncinin belirlenmesi için kullanılan yöntem gösterilmiştir.

Tablo 6. Kombinasyon Disk Testi ile Karbapenem Direncinin Belirlenmesi (106)

Sinerji	Karbapenem Direnci
Sadece Boronik Asit	Sınıf A (KPC)
Sadece EDTA veya Dipikolinik Asit	Sınıf B (VIM, IMP, NDM)
Kloksasilin ve Boronik Asit	AmpC + Porin Kaybı
Sinerji yok ve Temosilin Dirençli	OXA-48 benzeri
Sinerji yok ve Temosilin Duyarlı	GSBL + Porin Kaybı

2.4.1.3. Biyokimyasal Testler

Carbapenemase Nordmann-Poirel (Carba NP) testi, karbapenemaz üreten bakterilerin ekstraktlarında imipenemin *in vitro* hidrolizini ortamın pH değişikliğini saptayarak ölçen bir testtir. İmipenemin hidrolizi sonucu pH düşer ve fenol kırmızısı indikatörü kırmızıdan sarıya döner. Bu yöntemin duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir (108). OXA-48 üreten mukoid suşlarda duyarlılık düşük kalabilmektedir (106). 2 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınabilmesi testin en önemli avantajlarından birisidir. Carba NP testi, organizmanın katı besiyerinde izole edilmesinden önce bile pozitif sinyal veren kan kültürlerinde karbapenemaz varlığını saptamak üzere başarıyla kullanılabilir (105). Modifiye Carba NP testi, pH'ın 7,8 yerine 7,5 olarak ayarlandığı ve lizis tamponu olarak %0,02 setil trimetil amonyum bromürün kullanıldığı karbapenemaz üretiminin daha iyi tanımlanmasını sağlayan bir varyanttır. Nitekim 191 *Enterobacterales* izolatıyla yapılan retrospektif bir çalışmada klasik Carba NP testi %84 duyarlılık %100 özgüllük gösterirken, modifiye Carba NP testinde duyarlılık %99 ve özgüllük %100 bulunmuştur. Başka bir çalışmada OXA-48 tespitinde duyarlılığın %54'e kıyasla %71 bulunması modifiye Carba NP testinin klasik Carba NP testinden daha iyi olduğunu göstermektedir. Carba NP II, hem karbapenemaz üretimini belirlemek hem de karbapenemaz sınıflarını ayırt etmek için geliştirilen bir başka testtir. Bu testte KPC tespiti için tazobaktam, MBL tespiti için EDTA kullanımı yoluyla spesifik enzim inhibisyonu ile bağlantılı olarak imipenem hidrolizinden kaynaklanan pH değişikliklerine göre sonuçlar yorumlanır (108).

Blue-Carba testi, indikatör olarak bromtimol mavisinin kullanıldığı bir Carba NP türevidir. Lizise gerek duymadan doğrudan bakteri kolonilerinden uygulanabilmesi ile

kolaylık sağlamaktadır. Carba NP testinde olduğu gibi 2 saat içinde sonuç alınmaktadır. Her izolat negatif kontrol ile birlikte karşılaştırılarak değerlendirilmelidir. Negatif kontrol mavi iken test edilen suşun yeşil veya sarı olması, negatif kontrol yeşil iken izolatın sarı renkli olması karbapenemaz üretimini gösterir. Sınıf A, B ve D'den karbapenemaz üreten toplam 44 *Enterobacteriales*'te duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bildirilmiştir. Carba NP'ye göre maliyetinin daha uygun olması avantaj sağlamaktadır. Ancak karbapenemaz tipinin belirlenememesi Carba NP II ile kıyaslandığında dezavantaj olarak gözükmemektedir (109).

β -CARBA testi, 1 ila 3 koloninin reaktifler ile karıştırıldığı ve 30 dakika içinde sonuçlanan bir biyokimyasal testtir. Rengin sarıdan turuncu, kırmızı veya mora dönüşmesi testin pozitif olduğunu göstermektedir. OXA-48 üreten suşlarda 30 dakikalık okuma süresinin yetersiz olabileceği bildirilmiştir. Aşırı K1 üreten *Klebsiella oxytoca*'da olduğu gibi diğer beta-laktamazlarla bazı yanlış pozitifliklere dikkat edilmelidir (106). Ayrıca pozitif sinyal veren kan kültürlerinde de bu test uygulanıp daha hızlı sonuç elde edilebilir. 70 adet karbapenemaz üreten ve negatif kontrol olarak 70 adet karbapenemaz harici beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* suşunun pozitif sinyal veren kan kültüründen izole edildiği bir çalışmada %100 duyarlılık ve %94,3 özgüllük bulunmuştur (110).

2.4.1.4. Karbapenemaz İnaktivasyon Metodu

Karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) ilk defa 2015'te Carba NP testine alternatif olarak tanımlanmıştır. 10 μ l öze dolusu test edilen bakteri kolonisiyle 10 μ g meropenem diskinin 400 μ l suda 2 saat boyunca inkübe edilmesi ve sonucunda meropenemin hidrolize uğraması esasına dayanır. Meropenem diski 0.5 McFarland bulanıklığında *E. coli* ATCC 25922 suşunun yoğun ekiminin yapıldığı MHA'ya yerleştirilir ve en az 6 saat olmak kaydıyla tercihen bir gecelik inkübasyona bırakılır. Eğer test edilen bakteri karbapenemaz üretmiyorsa meropenemin etkinliğini sürdürmesi beklenir ve belirgin bir inhibisyon zonu gözlenir. İnhibisyon zonunun gözlenmemesi ise test edilen suşun karbapenemaz ürettiğini gösterir. Bu testin duyarlılık ve özgüllüğünün yüksek olduğu gösterilmiştir. Ayrıca uygulama ve yorumlama kolaylığı ve ucuz maliyeti ile ön plana çıkmaktadır. Ancak inkübasyon süresinin uzunluğu ve karbapenemaz tür tayininin yapılamaması testin dezavantajlarından (111).

Düşük düzey karbapenemaz ekspresyonunun saptanmasındaki zorluk, MBL enzimlerinin etkinlikleri için divalan katyonlar gerektirmesi, OXA-48 benzeri enzimlerin azalmış hidrolitik aktivitesi gibi sebeplerden dolayı CIM testi karbapenemaz tespitinde kısıtlı bir test olarak görülmeye başlanmıştır. Test edilecek bakteriden 1 µl öze dolusu alınıp triptik soy broth besiyerinde süspansiyon edilmesi ve inkübasyonun 4 saate uzatılmasının testin karbapenemaz saptama yeteneğini artırdığı gözlenmiştir. CIM testindeki bu değişiklik modifiye karbapenemaz inaktivasyon metodu (mCIM) olarak tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalarla CIM testiyle kıyaslandığında mCIM testinin duyarlılığın daha yüksek olduğu gösterilmiştir. CIM gibi 1 gecelik inkübasyon gerektirmekte ve karbapenemaz tür tayini yapılamamaktadır (108).

CIM ve mCIM testlerinin karbapenemaz türlerini belirleyememesi yeni bir modifiye testin ortaya çıkmasına sebep olmuştur. Bu yöntemde mCIM testinde olduğu gibi 1 µl öze dolusu bakteri triptik soy broth besiyerinde süspansiyon edilir, aynı şekilde ikinci bir süspansiyon daha hazırlanır ve ikinci tüpe 5 mM EDTA eklenir ve bu ikinci tüp eCIM testi olarak isimlendirilir. Her iki tüpe de 10 µg meropenem diski konulur ve 35 °C'de 4 saat ± 15 dakika inkübe edilir. Diskler tüpten çıkartılıp 0,5 McFarland bulanıklığında *E. coli* ATCC 25922 suşunun yoğun ekiminin yapıldığı MHA'ya aralarında belli bir uzaklık kalacak şekilde yerleştirilir ve plak 35 °C'de 18 ± 2 saat inkübe edilir. Birinci tüpe ait meropenem diskinin inhibisyon zon çapı ≥ 19 mm ise mCIM yönünden test negatif kabul edilir. 6-15 mm arasında ise veya 16-18 mm arasında olup inhibisyon zonunun içinde küçük koloniler halinde üreme gözlenmesi durumunda mCIM pozitif kabul edilir. İkinci tüpe ait meropenem diskinin inhibisyon zon çapı mCIM'inkine kıyasla ≥ 5 mm saptanırsa eCIM pozitif kabul edilir. İki zon çapı arasındaki fark < 4 mm ise eCIM testi negatif sonuçlandırılır. mCIM testi pozitif ve eCIM testi negatif saptanırsa serin beta-laktamaz üretimini, mCIM ve eCIM testinin her ikisinin de pozitifliği MBL üretimini göstermektedir. mCIM testi pozitif değilse eCIM testinin değerlendirilmesi yapılamamaktadır. Ambler sınıf A ve D karbapenemazları birbirinden ayıramasa da MBL varlığını tespit edebilmesi bu testi KDT hariç diğer fenotipik yöntemler arasında ön plana çıkarmaktadır (112).

2.4.1.5. MALDI-TOF MS

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri ve mantarları cins ve tür düzeyinde tanımlamak amacıyla kullanımı sıklıkla artan bir yöntemdir. Bu kullanımının yanı sıra iki ana yaklaşım üzerinden karbapenemaz üretiminin hızlı tanımlanmasına olanak veren MALDI-TOF MS, bu alanda gelecek vadettirmektedir. İlki ve daha sık kullanılması bakteriyel protein ekstraktlarının karbapenem substratı ile inkübe edildiği ve karbapenem bozunma ürünlerini tespit eden karbapenem hidroliz yaklaşımıdır. İkinci yaklaşım bilinen bir karbapenemaz taşıyan plazmid ile ilişkili protein pik noktasının saptanmasıdır (108).

Hidroliz yöntemiyle ilgili olarak bir dizi protokol tanımlanmıştır ancak standardize bir yöntem henüz mevcut değildir. Yöntemde kısaca, karbapenem bakteri kolonileri ile inkübe edilir, süspansiyon santrifüjlenir ve süpernatantlar MALDI-TOF MS ile karbapenem hidrolizi için analiz edilir. 4 saat içinde sonuç alınabilmesi ile ön plana çıkmaktadır. Test, bildirilen raporlarla %77 ila %100 arası duyarlılık ve %94 ila %100 arası özgüllüğe sahiptir (108). OXA-48 benzeri enzimleri tanımlamada zorluklar bildirilmiştir. Reaksiyon tamponuna amonyum bikarbonat (NH_4HCO_3) eklenmesinin diğer enzimlerin saptanma yeteneği etkilenmeden OXA-48-benzeri karbapenemaz saptanmasında duyarlılığı artırdığı gösterilmiştir (106,108). Teste OXA-48 benzeri enzimlerin tespit duyarlılığını artırmak için temosilin, sınıf A karbapenemazlar için fenil boronik asit (PBA), sınıf B karbapenemazlar için DPA eklenebilir. Temosiline ait özgül piklerin kaybolması OXA-48 için, PBA veya DPA eklentisi ile karbapeneme ait özgül piklerin tekrardan gözlenmesi de sırasıyla sınıf A ve sınıf B karbapenemazlar için anlamlıdır (113).

Plazmid ile ilişkili protein pik noktası tespiti, KPC-3 üreten *K. pneumoniae* kaynaklı bir hastane salgınının retrospektif değerlendirildiği bir çalışmada başarıyla uygulanmıştır. *bla*_{KPC} taşıyan pKpQIL plazmidinin bir gen ürününe karşılık gelen yaklaşık 11.109 Da ağırlığında bir kütle spektrometri pik noktası tanımlanmıştır. 10 dakika gibi kısa bir sürede sonuç alınması hidroliz yöntemlerine kıyasla önemli bir avantaj sağlamaktadır. *bla*_{KPC} taşıyan 140 *Enterobacteriaceae* izolatında yapılan başka bir çalışma hem duyarlılık hem de özgüllüğü %95'in üzerinde bildirmiştir. Karbapenem direncine sebep olan diğer plazmidler için de özgül piklerin tanımlanması bu yöntemin uygulanma sıklığını artırabilir (108).

2.4.1.6. Lateral Akım

Lateral akım temelli geliştirilen kitler karbapenemazların hem varlığını hem türünü belirlemek için kullanılan antikör temelli yöntemlerdir. Epidemiyolojik önemi olan karbapenemazları saptayabilirler fakat daha nadir görülen karbapenemaz türleri bu yöntemle tespit edilememektedir. 15 dakika içinde sonuç alınabilmesi, uygulama ve yorumlama kolaylığı, tür tayin edebilme gibi avantajlara sahiptir (108).

KPC, VIM, NDM, IMP ve OXA-48 benzeri karbapenemazları aynı anda saptayabilen bir multipleks lateral akım karbapenemaz testi geliştirilmiş ve 296 *Enterobacteriaceae*'da %100 duyarlılık ve %95 özgüllük göstermiştir (114). OXA-48 benzeri karbapenemazları saptamaya yönelik 4 dakikada sonuç verebilen ve 75 *Enterobacteriaceae*'da %100 duyarlılık ve özgüllük gösteren bir kit de bulunmaktadır. Bu kit ile pozitif sinyal veren kan kültürlerinden de doğrudan değerlendirme yapılabilmektedir ve duyarlılık ve özgüllük %100 olarak bildirilmiştir (115).

2.4.1.7. Kromojenik Besiyerleri

Kolonize ve enfekte hastalarda karbapenem dirençli suşların tespiti için kromojenik besiyerleri kullanılabilir. CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Fransa) karbapenemlere karşı yüksek düzeyde direnci tespit eder. Hem KPC hem de VIM üreten *Enterobacterales* için yararlı bir tarama besiyeridir. Ancak bu besiyerinin en büyük dezavantajı OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten suşların düşük düzeyde direncini tespit edememesidir. Brilliance CRE agar (Oxoid, Thermofisher Scientific, İngiltere) iki kromojenik sistem kullanan ve *E. coli*'yi pembe, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *Citrobacter* spp. izolatlarını mavi renkte gösteren bir besiyeridir. Testin genel duyarlılığı %76, özgüllüğü ise %57 olarak bildirilmiştir. Sınıf A karbapenemazlar için %85, sınıf B için %78, sınıf D için %69 duyarlılığa sahiptir. *Enterobacterales* suşlarında CHROMID Carba (bioMérieux, Fransa) %100 duyarlılık %93 özgüllük, Colorex KPC (Biomed Diagnostics, ABD) %97 duyarlılık %96 özgüllük göstermiştir. SUPERCARBA besiyeri, belli konsantrasyonda bir karbapenemin Drigalski agar ortamına eklenmesiyle elde edilir. Besiyerinde ayrıca yüksek düzey sefalosporinaz sentezleyen bakterilerin üretimini baskılamak için kloksasilin ve çinko sülfat ($ZnSO_4$) bulunmaktadır. Genel duyarlılığı %96 olmakla birlikte, KPC ve OXA-48 üreten suşlarda %100 duyarlılık ve %67-82 arası özgüllüğe sahiptir. Duyarlılık sınıf A için %100, sınıf B için %92-94, sınıf D için %100

olarak bildirilmiştir. Genel olarak OXA-48'i kromojenik besiyerlerinde saptamak zor olduğu halde SUPERCARBA bu konuda büyük başarı göstermektedir. Rektal sürüntü ve gaita örneklerinde karbapenemaz taraması için de kullanılabilir. Düşük düzey karbapenem üretimini saptamada da başarılıdır (116).

2.4.1.8. Gradient Test

MBL'leri saptamak için imipenem ve imipenem + EDTA kombinasyonunu içeren gradient testler kullanılabilir. Düşük düzeydeki karbapenemaz aktivitelerinde testin başarısı düşmektedir (117).

2.4.2. Genotipik Yöntemler

Genotipik yöntemler karbapenemaz saptanması ve türlerinin belirlenmesinde altın standart yöntemler olarak kabul edilmektedir (12,116-119). Genotipik yöntemler başlıca PCR temelli testler ve mikroarray testlerinden oluşur (12,117). Hızlı sonuç alma süresi, yüksek duyarlılık ve özgüllük genotipik testlerin avantajları arasındadır. Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar için önemli bir kaynak oluştururlar (117,118). Ancak bu testler fenotipik yöntemlere kıyasla karmaşıktır, maliyetli ekipman ve eğitilmiş personel gerektirir (12,117-119). Hedef genlerdeki alel çeşitliliği, tanımlanmamış yeni genlerin veya nadir bulunan genlerin saptanamaması genotipik yöntemlerin diğer dezavantajlarıdır (117).

PCR temelli testler olarak geleneksel PCR ve multipleks PCR kullanılabilir. Real-time PCR ile sonuç alma süresi hızlandırılabilir. Kültürde üretilen bakterilerin yanı sıra rektal sürüntü ve gaita gibi doğrudan klinik örneklerden sonuç alınabilir (117,118). 2006'dan 2012'ye kadar KPC, VIM, NDM, IMP ve OXA-48 gibi sık görülen karbapenemazların bir kısmının tespiti için multipleks real-time PCR sistemi geliştirilmiştir (119). 2012'de NDM, KPC, GES, IMP, VIM ve OXA-48'i aynı anda saptayabilen ve genomik DNA ekstraksiyonu dahil olmak üzere 3 saat içerisinde sonuç alınabilen multipleks real-time PCR yöntemi *Enterobacteriaceae*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* izolatlarında %100 duyarlılık ve %100 özgüllük göstermiştir (120).

Mikroarray, kısa sürede çok sayıda farklı geni aynı anda tespit edebilen umut verici bir tanımlama yöntemidir. Direnç genlerinin karakterizasyonunda ve moleküler

epidemiyolojide önemi artmaktadır. Bu teknik, tek nükleotit polimorfizmlerinin hızlı bir şekilde tanımlanmasına ve çok parametrelili analizlere olanak tanıdığından ve çok küçük hacimli örnekler kullanarak zaman ve maliyeti azalttığından dolayı geleneksel yöntemlere göre önemli bir avantaja sahiptir. Check-MDR CT102 DNA Microarray (Check-Points Health BV, Hollanda) SHV, TEM, CTX-M gibi GSBL gen aileleri ve KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48 gibi en sık görülen karbapenemazları saptayabilen mikroarray temelli ticari bir kitledir. Yapılan çalışmalar çoğu izolat için %100 duyarlılık ve özgüllüğe sahip olduğunu göstermektedir (117).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmaya Alınan Örnekler

Çalışmaya 16 Mart 2021–12 Mart 2022 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen kan, idrar, derin trakeal aspirat, balgam, kateter, yara, periton, doku biyopsi örneklerinden izole edilen ve karbapenem grubu en az bir antibiyotiğe dirençli 100 *K. pneumoniae* suşu dahil edildi. Aynı hastadan kültür türü fark etmeden sadece tek örnek çalışmaya alındı.

Suşlar %15 gliserollü Brain Heart Infusion Broth besiyerine aktarıldı ve çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.1.1. Bakteri Tanımlaması

Rutin olarak örnekler %5 koyun kanlı agar ve EMB agara ekildi. Plaklar aerobik etüvde 16-24 saat inkübe edildi. Mukoid görünümlü ve EMB agarda laktoz pozitifliğine işaret eden opak koloniler VITEK 2 COMPACT (bioMérieux, Fransa) otomatize sistemiyle tür düzeyinde tanımlandı. Tanımlamada üretici firmanın sağlamış olduğu GN kartı kullanıldı ve saf üreyen koloniler 0,50-0,63 McFarland yoğunluğunda %0,45 steril serum fizyolojik içerisinde süspansiyon edildi ve cihaza aktarıldı. Sistem tarafından %99 doğrulukta *K. pneumoniae* olarak raporlanan suşlar çalışmaya dahil edildi.

3.1.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Bakteri tanımlaması yapmak amacıyla hazırlanan bakteri süspansiyonundan 145 µL alınarak 3 ml %0,45 steril serum fizyolojik içerisine aktarıldı. Üretici firmanın sağlamış olduğu AST-N325, AST-N326 ve AST-N327 antibiyogram kartlarından biri kullanılarak otomatize cihaza aktarıldı. Sistem tarafından raporlanan antibiyogram sonuçları EUCAST tarafından önerilen klinik sınır değerlere göre kontrol edildi (121).

Meropenem, imipenem veya ertapenemden en az birine dirençli bulunan suşlar çalışmaya dahil edildi.

3.2. Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. %5 Koyun Kanlı Agar

Ticari olarak hazır besiyeri (RTA Laboratuvarları, Türkiye) kullanıldı.

3.2.2. Eozin Metilen Blue (EMB) Agar

Ticari olarak hazır besiyeri (RTA Laboratuvarları, Türkiye) kullanıldı.

3.2.3. Mueller Hinton Agar (MHA)

Ticari olarak satılan ve toz halinde bulunan Mueller Hinton Agar II (Condalab, İspanya) firma önerileri doğrultusunda 38 gr/L olacak şekilde hassas terazide tartıldı ve distile suda çözdürüldü. 121 °C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika boyunca otoklavda (Hirayama HG-80, Japonya) sterilize edildi ve 50 °C'ye kadar soğumaya bırakıldı. Sonrasında biyogüvenlik kabininde 90 mm çapındaki boş petrilere besiyeri kalınlığı 4 mm olacak şekilde aseptik şartlarda 25 ml kadar döküldü ve katılaşmaya bırakıldı. Hazırlanan besiyerinin üretim tarihi not edildi ve besiyeri çalışma gününe kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.4. %15 Gliserollü Brain Heart Infusion Broth

Ticari olarak satılan ve toz halinde bulunan Brain Heart Infusion Broth (Condalab, İspanya) firma önerileri doğrultusunda 37 gr/L olacak şekilde hassas terazide tartıldı ve distile suda çözdürüldü. Üzerine toplam hacmin %15'si olacak şekilde gliserol tartılıp

eklendi ve karıştırıldı. 121 °C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edildi. Soğuduktan sonra 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 1 ml olacak şekilde aseptik şartlarda aktarıldı. Hazırlanan besiyeri kullanılmak üzere +4 °C'de saklandı.

3.3. Suşların Canlandırılması

-20 °C'de stok besiyerinde saklanan suşlar buzdolabından çıkarıldı. Tüp içeriğinin erimesi beklenmeden tüpün üst kısmından steril öze ile hafif kazıyarak birer öze dolusu alındı ve %5 koyun kanlı agar ve EMB agara aseptik şartlarda tek koloni ekimi yapıldı. Suşların saflığı kontrol edildi.

3.4. Kombinasyon Disk Testi (KDT)

3.4.1. Testin Uygulanması

Taze kültürden saf koloniler steril eküvyon yardımıyla alındı ve içerisinde steril serum fizyolojik bulunan plastik tüplere aktarıldı. DensiCHEK Plus (bioMérieux, Fransa) optik okuyucusu ile 0,5 McFarland bulanıklığına eşit süspansiyon hazırlandı. Steril eküvyon tüpün dibine daldırılıp çıkarıldı ve fazla sıvının atılmasını sağlamak için tüpün kenarlarına bastırıldı. Eküvyon, MHA'ya boşluk kalmayacak şekilde yatay hareketlerle ekildi. Plak iki kez 60° çevrildi ve aynı teknikle toplamda 3 kadranda ekildi. Besiyeri yüzeyinin kuruması beklendikten sonra meropenem (10 µg) diski, meropenem + boronik asit (10/600 µg) diski, meropenem + dipikolinik asit (10/1000 µg) diski, meropenem + kloksasilin (10/750 µg) diski ve temosilin (30 µg) diski (Bioanalyse, Türkiye) besiyerinin yüzeyine yerleştirildi. Plak 35 °C'de 18-20 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.2. Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması

Negatif kontrol amacıyla *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 (karbapenemaz negatif) suşu, KPC pozitif kontrol amacıyla *Klebsiella pneumoniae* Culture Collection University of Gothenburg (CCUG) 56233, MBL pozitif kontrol amacıyla *Klebsiella pneumoniae* National Collection of Type Cultures (NCTC) 13443 suşu kullanıldı.

3.4.3. Sonuçların Değerlendirilmesi

Plaklar etüvden çıkartıldı ve her bir diskin inhibisyon zon çapları plağın arkasından ölçüldü. Temosilin diski tek başına değerlendirildi ve 12 mm veya üzerinde olması durumunda duyarlı olarak kabul edildi. İnhibitör içeren disklerin zon çapları meropenem diskiyle karşılaştırıldı. Tablo 7’de KDT sonuçlarının değerlendirilmesi gösterilmiştir.

Tablo 7. Kombinasyon Disk Testi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

	Meropeneme Kıyasla Zon Çapında Artış			Temosilin
	Meropenem + Boronik Asit	Meropenem + Dipikolinik Asit	Meropenem + Kloksasilin	
KPC	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Değişken
MBL	< 4 mm	≥ 5 mm	≤ 3 mm	Değişken
AmpC + Porin Kaybı	≥ 4 mm	≤ 3 mm	≥ 5 mm	≥ 12 mm
GSBL + Porin Kaybı	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≥ 12 mm
OXA-48 benzeri	≤ 3 mm	≤ 3 mm	≤ 3 mm	Zon yok

3.5. PCR Yöntemi ile Karbapenemaz Direnç Genlerinin Saptanması

3.5.1. Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu

Ekstraksiyon amacıyla Bakteri Genomik DNA İzolasyon Kiti (Hibrigen, Türkiye) kullanıldı. Liyofilize halde bulunan 90 mg Proteinaz K, 4500 µl Proteinaz K dilüsyon solüsyonu ile sulandırıldı ve 20 mg/ml konsantrasyonunda Proteinaz K elde edildi. Liyofilize halde bulunan 4 mg Ribonükleaz A (RNaz A), 200 µl RNaz A dilüsyon solüsyonu ile sulandırıldı ve 20 mg/ml konsantrasyonunda RNaz A elde edildi. BDY tamponunu kullanıma hazır hale getirmek için 10 ml BDY solüsyonunun üzerine 40 ml saf etanol eklendi. Firma önerileri doğrultusunda sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı:

1. Spin kolonların aktif hale gelmesi için üzerine 800 µl BE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında en az 30 dakika beklendi. Tüm sıvının süzülmesi için 10.900 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpündeki sıvı atıldı.
2. 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpünün içerisine 0,5 ml steril serum fizyolojik ve 3 öze dolusu bakteri kolonisi alındı ve kısa süreli vorteks yapıldı.
3. 10.900 x g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı.
4. Pelet 500 µl LB1 tamponu içerisinde çözdürüldü. 2 µl RNaz A eklendi ve vortekslendi.
5. 45 µl Proteinaz K eklendi.
6. 37 °C'de 30 dakika inkübe edildi.
7. 175 µl LB2 tamponu eklendi ve kısa süreli vortekslendi.
8. 50 °C'de 20 dakika inkübe edildi.
9. 10 saniye vortekslendi ve sıvının tamamı spin kolona aktarıldı.
10. 7600 x g'de 3 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
11. 500 µl BDY tamponu spin kolona eklendi.
12. 10.900 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
13. Tekrardan 500 µl BDY tamponu spin kolona eklendi.
14. 10.900 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı atıldı.
15. Hiçbir sıvı eklenmeden 10.900 x g'de 3 dakika santrifüj edildi ve toplama tüpü atıldı.
16. Spin kolon 1,5 ml'lik steril bir mikrosantrifüj tüpünün içine geçirildi.
17. Doğrudan membran üzerine 70 µl BDE tamponu eklendi.
18. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
19. 10.900 x g'de 2 dakika santrifüj edildi ve spin kolon atıldı.
20. Elde edilen DNA'lar çalışma gününe kadar -20 °C'de saklandı.

3.5.2. PCR Yönteminin Uygulanması

3.5.2.1. Kullanılan Primerler

Çalışmada *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{OXA-48} gen bölgelerini hedefleyen 5 farklı primer seti kullanıldı. Primer dizileri *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} için Doyle ve ark.'nın (122), *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} için Ellington ve ark.'nın (123) yaptığı çalışmaya uygun şekilde seçildi. Tablo 8'de primer dizileri ve bant büyüklükleri gösterilmiştir.

Tablo 8. Kullanılan Primerler ve Bant Büyüklükleri

Hedef Gen	Primer Adı	Primer Dizisi	Bant Büyüklüğü (bp)
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F	5'-TGTCACTGTATCGCCGTC-3'	1011
	KPC-R	5'-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC-3'	
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F	5'-GCAGCTTGTCGGCCATGCGGGC-3'	782
	NDM-R	5'-GGTCGCGAAGCTGAGCACCGCAT-3'	
<i>bla</i> _{VIM}	VIM-F	5'-GATGGTGTTTGGTCGCATA-3'	390
	VIM-R	5'-CGAATGCGCAGCACCAG-3'	
<i>bla</i> _{IMP}	IMP-F	5'-GGAATAGAGTGGCTTAAYTCT-3'	188
	IMP-R	5'-CCAAACYACTASGTTATCT-3'	
<i>bla</i> _{OXA-48}	OXA-48-F	5'-GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3'	438
	OXA-48-R	5'-CATCAAGTTCAACCCAACCG-3'	

F: Forward, R: Reverse, bp: baz çifti

3.5.2.2. PCR İçin Reaktiflerin Hazırlanması

Taq polimeraz olarak FIREPol DNA Polymerase (Solis BioDyne, Estonya), PCR tamponu olarak FIREPol 10x Buffer B (Solis BioDyne, Estonya) kullanıldı. Magnezyum klorür (MgCl₂) (25 mM) ve dNTP set (100 mM) de aynı firmadan temin edildi. Liyofilize halde bulunan 10 adet primer dizisi (Metabion, Almanya) her biri 10 µM (10 pmol/µl) olacak şekilde firma önerileri doğrultusunda sulandırıldı. 100 mM stok halinde bulunan

dATP, dTTP, dCTP, dGTP solüsyonları dNTP karışımı hazırlamak üzere tek bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve son konsantrasyon her biri için 10 mM olacak şekilde sulandırıldı. Tüm sulandırma işlemleri DNase/RNase free saf su ile yapıldı. Tablo 9 ve tablo 10'da PCR karışımında kullanılan reaktifler, reaksiyon başına hacimler ve konsantrasyonlar gösterilmiştir.

Tablo 9. *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* ve *bla_{OXA-48}* İçin PCR Karışımı

Reaktif	Hacim (Bir Örnek İçin)	Konsantrasyon (Bir Örnek İçin)
Taq Polimeraz (5U/μl)	0,25 μl	0,05 U/μl
10x Buffer	2,5 μl	1X
MgCl ₂	1,5 μl	1,5 mM
dNTP Karışımı	1 μl	400 μM (her biri)
Primer-F (<i>bla_{OXA-48}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-R (<i>bla_{OXA-48}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-F (<i>bla_{NDM}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-R (<i>bla_{NDM}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-F (<i>bla_{KPC}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-R (<i>bla_{KPC}</i>)	0,5 μl	200 nM
DNA	1 μl	
DNase/RNase Free Saf Su	15,75 μl	
Toplam Hacim	25 μl	

Tablo 10. *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* için PCR Karışımı

Reaktif	Hacim (Bir Örnek İçin)	Konsantrasyon (Bir Örnek İçin)
Taq Polimeraz (5U/μl)	0,25 μl	0,05 U/μl
10X Buffer	2,5 μl	1X
MgCl ₂	1,5 μl	1,5 mM
dNTP Karışımı	1 μl	400 μM (her biri)
Primer-F (<i>bla_{VIM}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-R (<i>bla_{VIM}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-F (<i>bla_{IMP}</i>)	0,5 μl	200 nM
Primer-R (<i>bla_{IMP}</i>)	0,5 μl	200 nM
DNA	1 μl	
DNase/RNase Free Saf Su	16,75 μl	
Toplam Hacim	25 μl	

3.5.2.3. Amplifikasyon

PCR protokolü Doyle ve ark.'nın (122) ve Ellington ve ark.'nın (123) yaptığı çalışmaya uygun şekilde optimize edildi. Hazırlanan PCR karışımı 0,1 ml'lik amplifikasyon tüplerine aktarıldı ve CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, ABD) cihazına yüklendi. *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* ve *bla_{OXA-48}* için 95 °C'de 5 dakika ilk denatürasyon sonrasında 95 °C'de 45 saniye denatürasyon, 60 °C'de 45 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika elongasyon ile toplam 35 döngü ve son uzama olarak 72 °C'de 8 dakika olmak üzere multipleks PCR gerçekleştirildi. *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* için 94 °C'de 5 dakika ilk denatürasyon sonrasında 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 52 °C'de 40 saniye primer bağlanması ve 72 °C'de 50 saniye elongasyon ile toplam 36 döngü ve son uzama olarak 72 °C'de 5 dakika olmak üzere multipleks PCR gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünleri jel elektroforezinde yürütülmek üzere +4 °C'de saklandı. PCR protokolleri Tablo 11 ve Tablo 12'de gösterilmiştir.

Tablo 11. *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}* ve *bla_{OXA-48}* İçin PCR Protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü
95 °C	5 dakika	1
95 °C	45 saniye	35
60 °C	45 saniye	
72 °C	1 dakika	
72 °C	8 dakika	1

Tablo 12. *bla_{VIM}* ve *bla_{IMP}* İçin PCR Protokolü

Sıcaklık	Süre	Döngü
94 °C	5 dakika	1
94 °C	30 saniye	36
52 °C	40 saniye	
72 °C	50 saniye	
72 °C	5 dakika	1

3.5.2.4. Kalite Kontrol Suşlarının Çalışılması

Klebsiella pneumoniae ATCC 25955 negatif kontrol, *Klebsiella pneumoniae* CCUG 56233 *bla_{KPC}* pozitif kontrol, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13440 *bla_{VIM}* pozitif kontrol, *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13443 *bla_{NDM}* pozitif kontrol, *Escherichia coli* NCTC 13476 *bla_{IMP}* pozitif kontrol olarak kullanıldı.

3.5.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme

PCR ile amplifiye edilen ürünlerin görüntülenmesi için yatay jel elektroforezi kullanıldı. Bu amaçla %1,5'lik agaroz jel hazırlamak için 2,4 gr agaroz hassas terazide tartıldı ve 160 ml 1X Tris-Asetik asit-EDTA (TAE) tamponu ile erlenmayerde karıştırıldı. Agarozun tamamen erimesi için mikrodalga fırında 3-4 dakika ısıtıldı. Karışımın yaklaşık

50 °C'ye kadar soğuması beklendi. İçerisine son konsantrasyon 0,5 µg/ml olacak şekilde 10 mg/ml'lik etidyum bromürden 8 µl konuldu ve karıştırıldı.

Elektroforez yatağına yükleme kuyucukları oluşturmak için taraklar konuldu ve karışım yavaşça yatağa döküldü. Oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Katılaştıran karışımın üzerinden taraklar çıkarıldı ve yatak elektroforez tankına (Bio-Rad, ABD) kuyucuklar katot tarafına yakın olacak şekilde yerleştirildi. Yatağın üzerini tamamen kaplayacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi.

Her uygulamada birinci ve sonuncu kuyucuğa moleküler belirteç olarak 100 bp DNA Ladder Plus (Hibrogen, Türkiye) yüklendi. Her bir örnekten 12,5 µl alındı ve 2,5 µl 6X jel yükleme boyası (Hibrogen, Türkiye) ile karıştırıldı ve 15 µl'lik örnekler kuyucuklara yüklendi. Pozitif ve negatif kontroller örneklerle aynı hacimlerde kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra tankın kapağı kapatıldı ve tank güç kaynağına bağlandı.

130 volt elektrik akımında 60 dakika yürütülen örnekler ultraviyole transillüminatör (Major Science, ABD) görüntüleme cihazı ile incelendi. Oluşan bantların büyüklüğünü tayin etmek için moleküler belirteçle kıyaslama yapıldı.

3.5.4. İstatistiksel Analiz

Nicel veriler, yüzde, ortalama, standart sapma olarak belirtilmiştir. KDT, altın standart yöntem olan PCR ile karşılaştırılmış ve duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerler belirlenmiştir. Kategorik verilerin karşılaştırılmasında Fisher kesin ki-kare testi kullanılmıştır. Verilerin analizinde SPSS 21 (SPSS Inc., ABD) programı kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

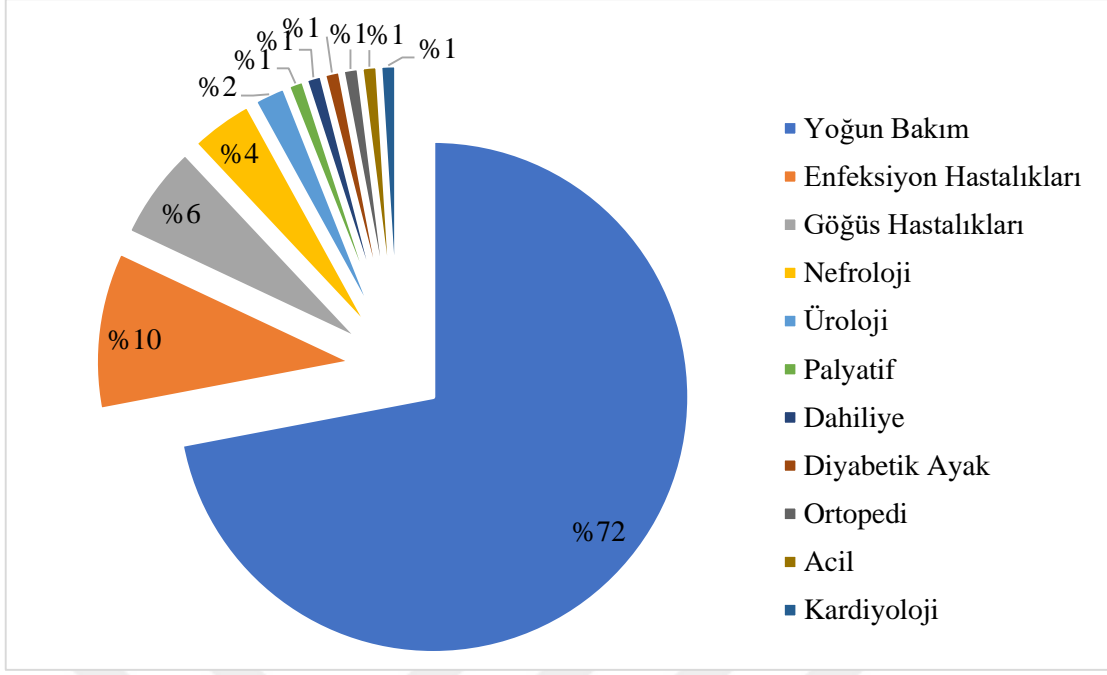
4.1. Bakteri Suşlarının ve Hastaların Genel Özellikleri

Çalışma 16 Mart 2021–12 Mart 2022 tarihleri arasında Hitit Üniversitesi Çorum Erol Olçok Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen ve karbapenem grubundaki en az bir antibiyotiğe dirençli 100 *K. pneumoniae* suşunu içermektedir.

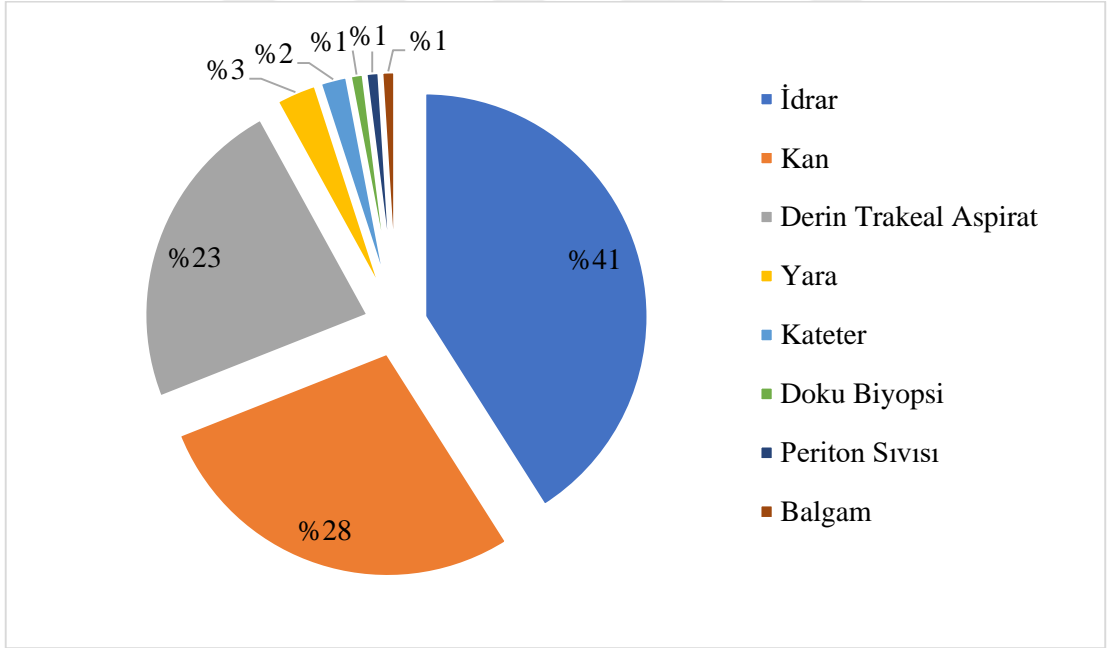
Örneklerin 62'si (%62) erkek, 38'i (%38) kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların yaşı 18-95 arasında değişkenlik göstermektedir ve yaş ortalaması 72,74'tür.

Örneklerin gönderilen kliniklere göre dağılımı incelendiğinde yoğun bakım ünitelerinin (YBÜ) büyük bir çoğunluğu (%72) oluşturduğu gözlenmektedir. İkinci ve üçüncü sıklıkta sırasıyla enfeksiyon hastalıkları (%10) ve göğüs hastalıkları servisi (%6) gelmektedir. Şekil 2'de örneklerin kliniklere göre dağılımı gösterilmiştir.

Örneklerin izole edildiği kültür türlerine bakıldığında idrar (%41), kan (%28) ve derin trakeal aspirat (%23) örnekleri büyük çoğunluğu oluşturmaktadır. Şekil 3'te örneklerin kültür türüne göre dağılımı gösterilmiştir.



Şekil 2. Örneklerin Kliniklere Göre Dağılımı

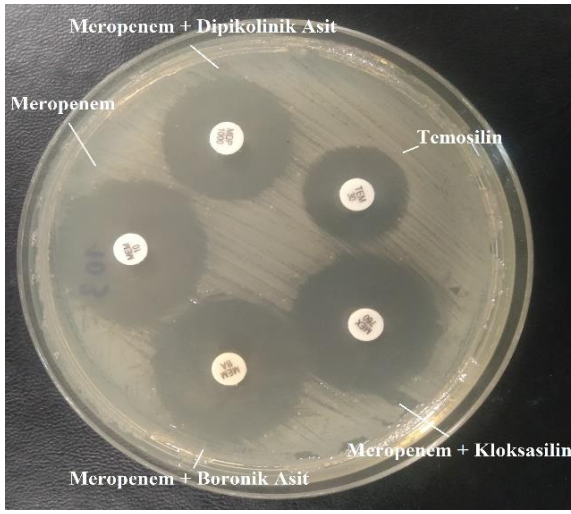


Şekil 3. Örneklerin Kültür Türüne Göre Dağılımı

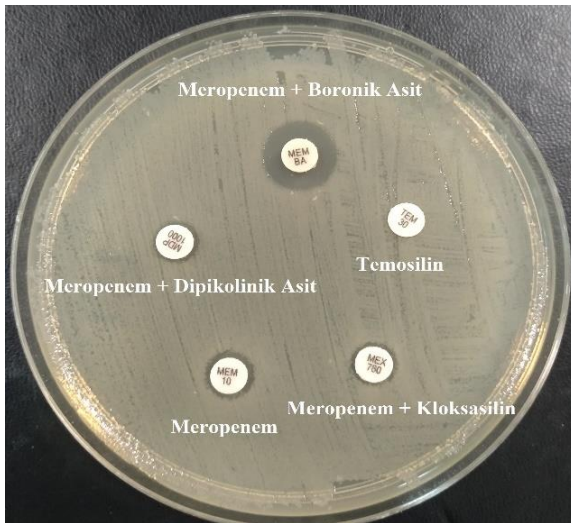
4.2. Kombinasyon Disk Testi Sonuçları

Kalite kontrol amacıyla çalışmaya alınan *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 (karbapenemaz negatif) suşunda meropenem inhibisyon zon çapı 30 mm olarak ölçülmüş

ve meropeneme duyarlı olarak bulunmuştur. İnhibitörle kombine disklerin meropenemle kıyaslamasında inhibisyon zon çapları arasındaki fark 3 mm'den az bulunmuştur. Resim 1'de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 suşunun KDT uygulanan plak görüntüsü gösterilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* CCUG 56233 (*bla*_{KPC} pozitif) suşunda meropenem + boronik asit diskinin inhibisyon zon çapı meropeneme kıyasla 4 mm fazla saptanmıştır. Resim 2'de plak görüntüsü gösterilmiştir. *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13443 (*bla*_{NDM} pozitif) suşunda meropenem + dipikolinik asit diskinin inhibisyon zon çapı meropeneme kıyasla 6 mm fazla saptanmıştır. Resim 3'te plak görüntüsü gösterilmiştir.



Resim 1. *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 KDT Plak Görüntüsü



Resim 2. *Klebsiella pneumoniae* CCUG 56233 KDT Plak Görüntüsü



Resim 3. *Klebsiella pneumoniae* NCTC 13443 KDT Plak Görüntüsü

Çalışılan örneklerin 87'si (%87) OXA-48 benzeri, 13'ü (%13) MBL pozitif olarak saptanmıştır. Resim 4'te OXA-48 benzeri, resim 5'te MBL pozitif örneklerle ait görüntüler gösterilmiştir.



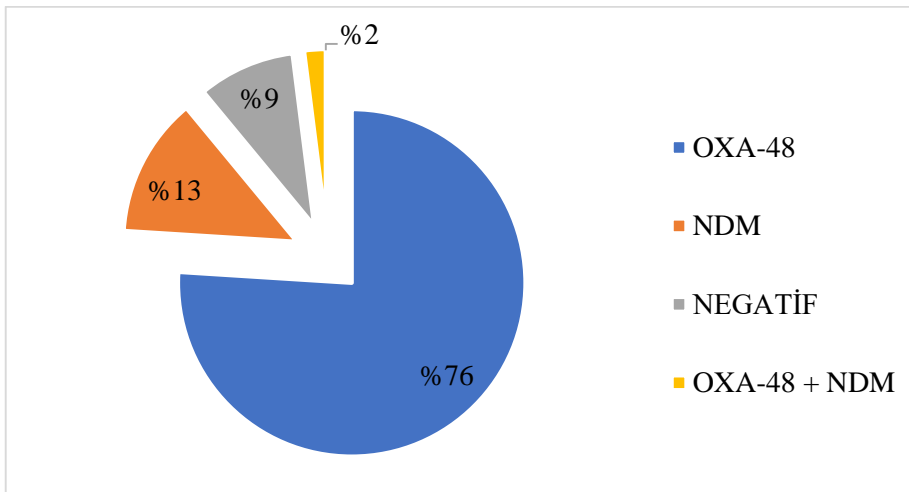
Resim 4. OXA-48 Benzeri Pozitif Örneğe Ait KDT Plak Görüntüsü



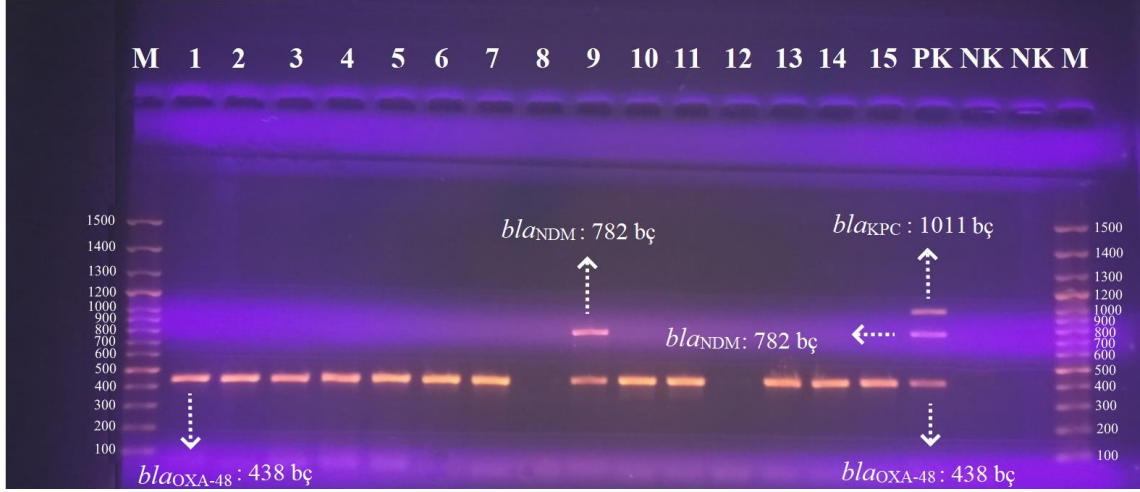
Resim 5. MBL Pozitif Örneğe Ait KDT Plak Görüntüsü

4.3. PCR Sonuçları

Çalışmaya alınan 100 örneğin 76'sı (%76) *bla*_{OXA-48}, 13'ü (%13) *bla*_{NDM}, 2'si (%2) *bla*_{OXA-48} + *bla*_{NDM} pozitif olarak saptanmıştır. Örneklerin hiçbirinde *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM} ve *bla*_{IMP} genleri saptanmamıştır. 9 (%9) örnekte hedeflenen 5 direnç geninin hiçbirisi tespit edilmemiştir. Şekil 4'te PCR yöntemine göre karbapenemaz genlerinin dağılımı gösterilmiştir. Agaroz jelde yürütülen amplifikasyon ürünleri moleküler belirteç ile kıyaslanmıştır ve bant büyüklüğüne göre yorumlanmıştır. Resim 6 ve resim 7'de 15 örneğin ultraviyole ışık altında görüntülenen bantlarına ait görüntü gösterilmiştir.

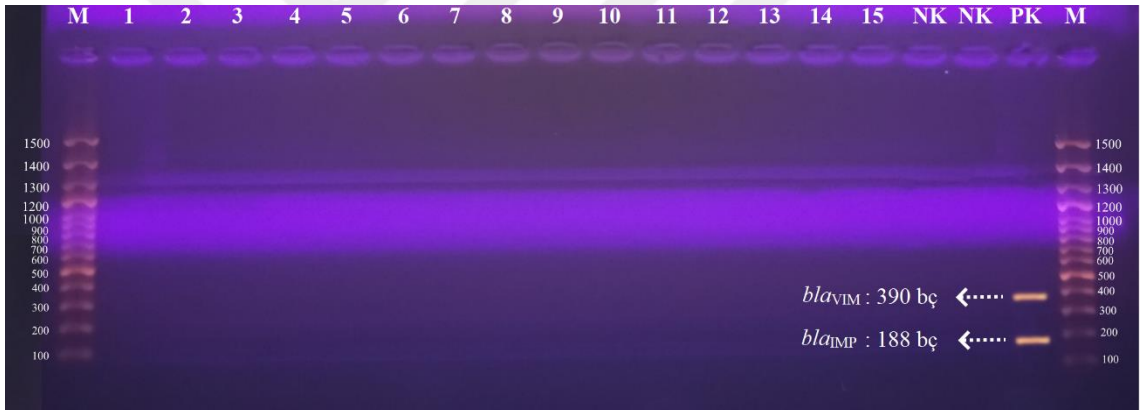


Şekil 4. PCR Yöntemine Göre Karbapenemaz Genlerinin Dağılımı



Resim 6. Örneklerin Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi ve Yorumlanması-1

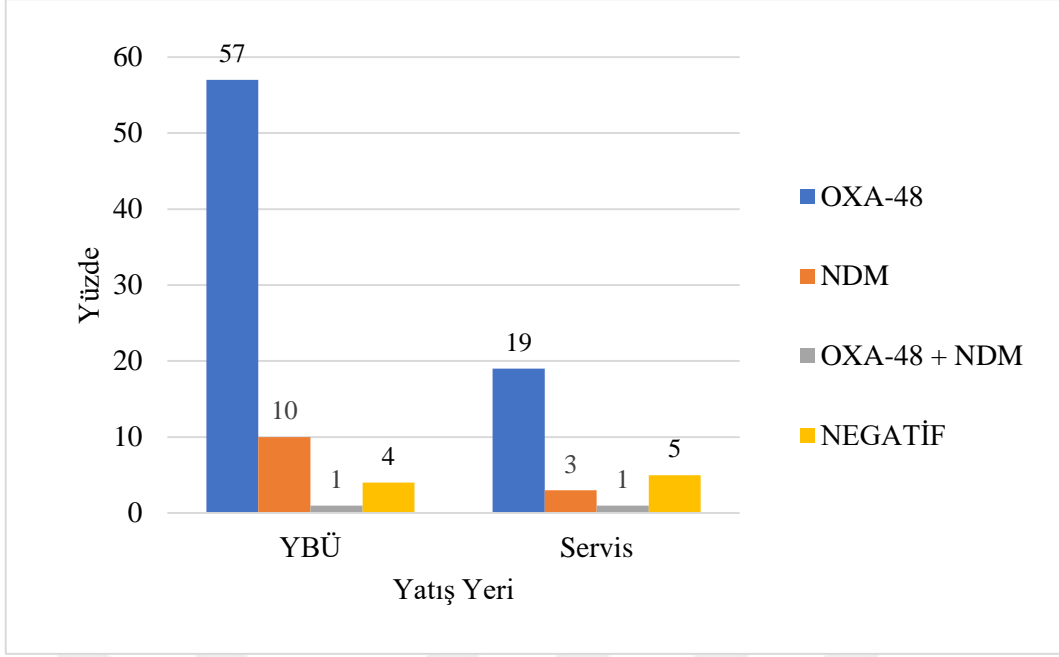
M: Moleküler Belirteç, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol, bç: baz çifti, [1-15]: Örnekler



Resim 7. Örneklerin Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi ve Yorumlanması-2

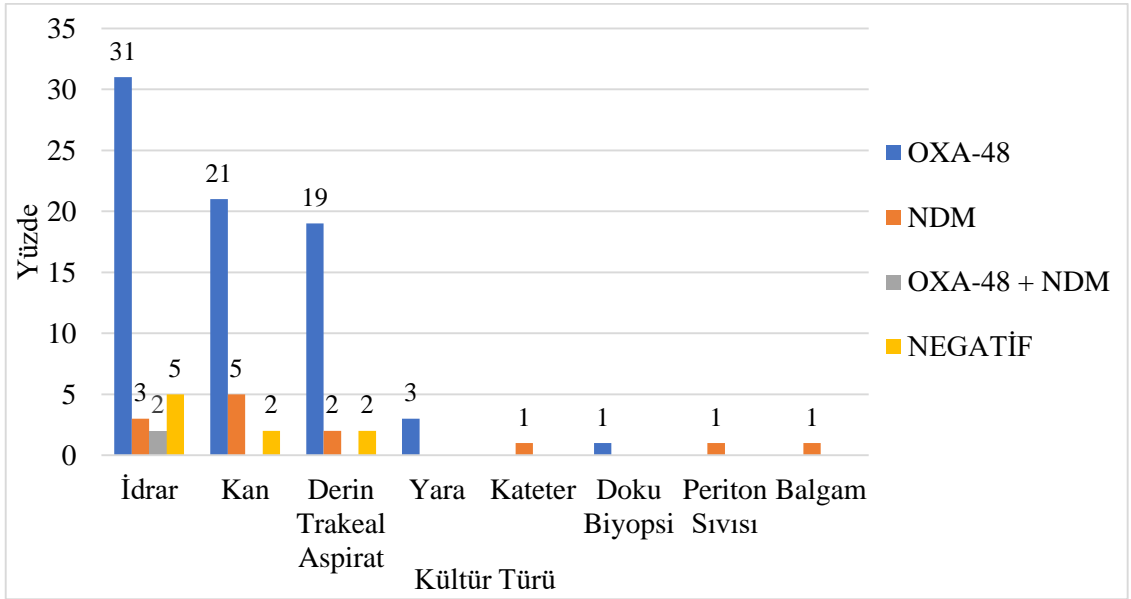
M: Moleküler Belirteç, PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol, bç: baz çifti, [1-15]: Örnekler

Örneklerin gönderildiği klinik birimlere göre PCR’da saptanan genotip arasındaki ilişki incelendiğinde hastaların YBÜ veya serviste yatmasıyla direnç genleri saptanma sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0,204$). Şekil 5’te hastaların yatış yerine göre PCR sonuçları gösterilmiştir.



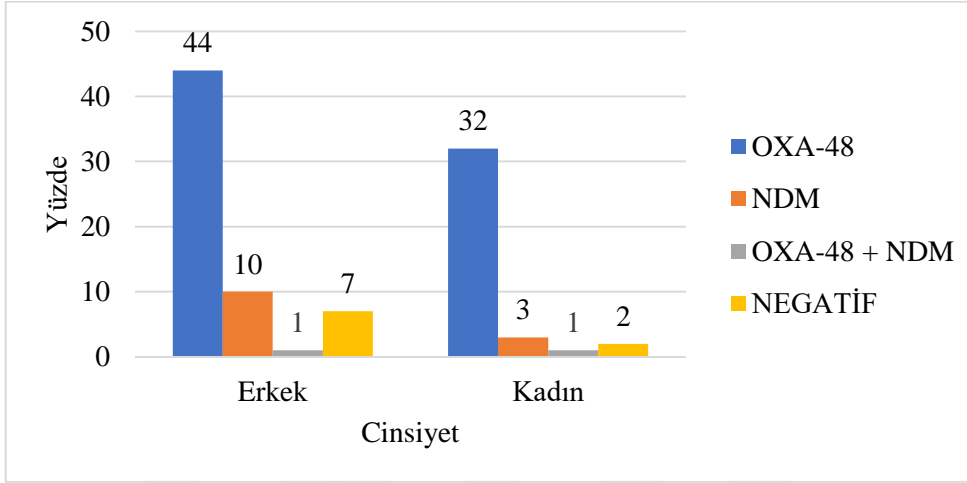
Şekil 5. Yatış Yerine Göre PCR Sonuçları

Örneklerin izole edildiği kültür türü ile direnç genleri saptanma sıklığı arasındaki ilişki araştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0,221$). Şekil 6'da örneklerin izole edildiği kültür türüne göre PCR sonuçları gösterilmiştir.



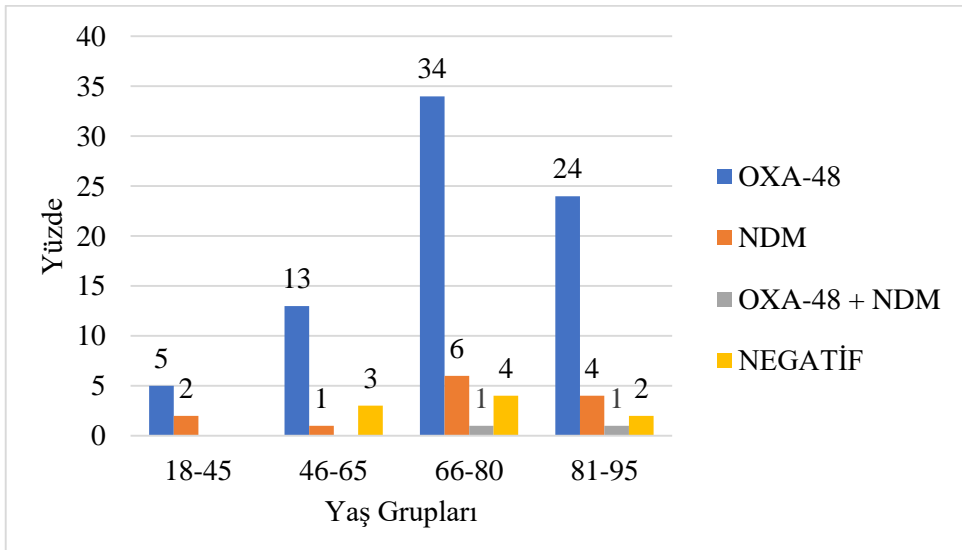
Şekil 6. Kültür Türüne Göre PCR Sonuçları

Cinsiyetin karbapenemaz genlerinin saptanma sıklığı arasındaki ilişkiye bakıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0,505$). Şekil 7’de cinsiyete göre PCR sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 7. Cinsiyete Göre PCR Sonuçları

Hastaların yaşı 18-45, 46-65, 66-80 ve 81-95 arası olarak 4 gruba ayrıldığında gruplarla karbapenemaz genlerinin saptanma sıklığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0,204$). Şekil 8’de yaş gruplarına göre PCR sonuçları gösterilmiştir.



Şekil 8. Yaş Gruplarına Göre PCR Sonuçları

4.4. Kombinasyon Disk Testi ile PCR Yönteminin Karşılaştırılması

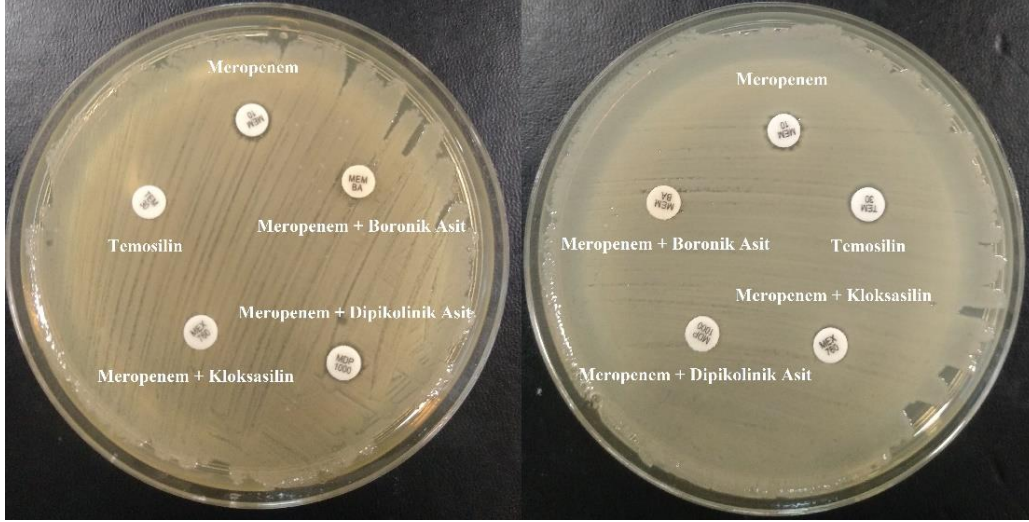
Çalışmada 100 KdKp suşuna KDT ve PCR uygulanmıştır. Karbapenemaz direnç genlerinin saptanmasında PCR altın standart kabul edildiğinden dolayı KDT, PCR ile kıyaslanmıştır ve KDT için duyarlılık ve pozitif prediktif değer hesaplanmıştır. Karbapenem duyarlı izolatlar çalışmaya dahil edilmediği için KDT'nin genel özgüllüğü ve negatif prediktif değeri hesaplanmamıştır.

KDT ile 100 örneğin tamamında pozitiflik saptanırken PCR ile 91 (%91) örnek pozitif, 9 (%9) örnek negatif saptanmıştır. Testlerin pozitif ve negatif oranları tablo 13'te gösterilmiştir. Test yöntemlerinin kıyaslamasında karbapenemaz varlığını saptama yönünden KDT'nin duyarlılığı %100, pozitif prediktif değeri ise %91 olarak bulunmuştur.

Tablo 13. Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Genel Karşılaştırması

Yöntem	PCR			
	Sonuç	Pozitif	Negatif	Toplam
Kombinasyon Disk Testi (KDT)	Pozitif	91	9	100
	Negatif	-	-	-
	Toplam	91	9	100

İki testin ayrıntılı karşılaştırılmasında PCR ile OXA-48 pozitifliği saptanan 76 örneğin tamamı KDT ile OXA-48 benzeri pozitif saptanmıştır. PCR'ın NDM saptadığı 13 örneğin tamamı KDT ile MBL pozitif olarak saptanmıştır. PCR ile OXA-48 + NDM saptanan 2 örnek KDT ile OXA-48 benzeri pozitif olarak saptanmıştır. İki yöntem arasındaki uyumluluk %89 olarak bulunmuştur. Resim 7'de PCR'da OXA-48 + NDM pozitif saptanan örneğin KDT plak görüntüsü gösterilmiştir. PCR'da negatif sonuçlanan 9 örneğin tamamı KDT ile OXA-48 benzeri pozitif olarak saptanmıştır. Tablo 14'te KDT ile PCR sonuçlarının genotip bazında karşılaştırması gösterilmiştir.



Resim 8. PCR ile OXA-48 + NDM Pozitif Saptanan Örneklerin KDT Plak Görüntüsü

KDT'nin sadece OXA-48 pozitifliği olan izolatlardaki duyarlılığı %100, özgüllüğü %54,1, pozitif prediktif değeri %87,3, negatif prediktif değeri %100 olarak saptanmıştır. Tablo 15'te OXA-48 için değerler gösterilmiştir. KDT'nin yalnızca NDM pozitif izolatlardaki duyarlılığı %100, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %100 olarak bulunmuştur. Tablo 16'da NDM için değerler gösterilmiştir.

Tablo 14. Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Genotip Karşılaştırması

Yöntem	PCR					
	Genotip	OXA-48	NDM	OXA-48 + NDM	Negatif	Toplam
Kombinasyon Disk Testi (KDT)	OXA-48 benzeri	76	-	2	9	87
	MBL	-	13	-	-	13
	OXA-48 benzeri + MBL	-	-	-	-	-
	Negatif	-	-	-	-	-
	Toplam	76	13	2	9	100

Tablo 15. OXA-48 İçin Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Yöntem	PCR			Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
	Sonuç	Pozitif	Negatif				
Kombinasyon Disk Testi (KDT)	Pozitif	76	11	%100	%54,1	%87,3	%100
	Negatif	-	13				

PPD: Pozitif Prediktif Değer, NPD: Negatif Prediktif Değer

Tablo 16. NDM İçin Kombinasyon Disk Testi ve PCR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Yöntem	PCR			Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD
	Sonuç	Pozitif	Negatif				
Kombinasyon Disk Testi (KDT)	Pozitif	13	-	%100	%100	%100	%100
	Negatif	-	87				

PPD: Pozitif Prediktif Değer, NPD: Negatif Prediktif Değer

5. TARTIŞMA

K. pneumoniae hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir ve DSÖ tarafından yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulan kritik öncelikli antibiyotiğe dirençli bakteriyel patojenlerden biri olarak kabul görmektedir. Yapılan çalışmalar karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nın morbidite ve mortalite açısından Avrupa'da en hızlı büyüyen antibiyotik direnci tehdidini temsil ettiğini göstermektedir. *K. pneumoniae*'da karbapenem direncinin hızlı genişlemesi, genellikle son tercih antibiyotikler olan karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzimlerinin değişen derecelerde kazanılmasına bağlanmıştır. Sık görülen karbapenemazların plazmid aracılı aktarılması direncin hızla yayılmasına yol açmaktadır. Kendi başına önemli bir patojen olmasının yanı sıra *K. pneumoniae*, antibiyotik direnç genlerinin *Enterobacterales* takımı arasında yayılmasına da öncülük etmektedir (124).

Murray ve ark.'nın (125) 2022'de yayımlanmış olan ve 88 patojen-ilaç kombinasyonunu içeren çalışmasında dünya genelinde 2019 yılında doğrudan antibiyotik direncine atfedilebilir toplam ölüm 1,27 milyon olarak belirlenmiş ve antibiyotik direncine sahip *K. pneumoniae* bu ölümlerin 193.000'inden (%15,19) sorumlu tutulmuştur. Bu oran antibiyotik direnciyle doğrudan ilişkili ölümlerde *K. pneumoniae*'nın *E. coli*'nin ardından ikinci sırada olduğunu göstermektedir. Yine aynı çalışmada karbapenem direnciyle doğrudan ilişkili ölümlere bakıldığında 243.000 ölümün 55.700'ü (%22,92) *K. pneumoniae*'nın karbapenem direnciyle ilişkili bulunmuştur. Bu oran karbapenem direnciyle doğrudan ilişkili ölümlerde *K. pneumoniae*'nın *Enterobacterales* takımı içinde birinci, tüm bakteriler arasında ise *Acinetobacter baumannii*'nin arkasından ikinci sırada yer aldığını göstermektedir.

DSÖ tarafından 2022'de yayımlanan ve Avrupa'da antibiyotik direnç sürveyansını ele alan çalışmada 41 ülke/bölgeden toplanan kan ve beyin omurilik sıvısı örneklerinde *K. pneumoniae*'da karbapenem (imipenem/meropenem) direnci 2016

yılında 26.241 örnekte %8,4, 2017 yılında 27.686 örnekte %8,1, 2018 yılında 32.548 örnekte %8,5, 2019 yılında 35.439 örnekte %9, 2020 yılında 39.006 örnekte %10 olarak saptanmıştır. Türkiye'ye bakıldığında ise 2016'da 2.836 örneğin %29,5'i, 2017'de 3.165 örneğin %32,5'i, 2018'de 3.641 örneğin %34,4'ü, 2019'da 4.028 örneğin %39,4'ü ve 2020'de 4.517 örneğin %48,2'si dirençli bildirilmiştir. Hem genel hem de Türkiye oranlarına bakıldığında *K. pneumoniae*'da karbapenem direncinin yıllar geçtikçe artması ve Türkiye'deki oranların genel oranlara göre oldukça yüksek olması dikkat çekmektedir. Direnç sıklığının bölgelere dağılımına bakıldığında 2020'de Kuzey ve Batı Avrupa'daki 16 ülkede direnç %1'in altında, Belarus, Gürcistan, Yunanistan, Moldova, Rusya ve Ukrayna olmak üzere 6 ülkede %50'in üzerinde bulunmuştur (126).

Ulusal Sağlık Hizmeti İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı (USHİESA) 2021 raporlarına bakıldığında Türkiye'de 375 hastaneden pnömoni, üriner sistem enfeksiyonu, kan dolaşımı enfeksiyonu ve cerrahi alan enfeksiyonuna sebep olan toplam 8.548 *K. pneumoniae* suşunda karbapenem (imipenem/meropenem) direnci %63,57 olarak bulunmuştur (127). 2020 ile kıyaslandığında 8.174 örnekte %48,95 olan bu oranda anlamlı bir artış olduğu gözlenmektedir (128).

Karbapenemaz genlerinin epidemiyolojisi incelendiğinde kıtalar arası büyük farklılıklar görülmektedir. Kuzey Amerika kıtasına bakıldığında ABD'de en sık rastlanan karbapenemazın KPC olduğu ve KPC'nin ülke genelinde bazı eyaletlerde endemik olduğu görülmektedir. Bununla birlikte OXA-48, NDM, VIM ve IMP üreten suşlar da daha az sıklıkta bildirilmektedir. Kanada'da KPC, NDM ve OXA-48 sporadik salgınlar halinde gözlenmiştir. Güney Amerika kıtasında Brezilya, Arjantin ve Kolombiya'da KPC endemik olarak bulunmaktadır. Kıtanın diğer ülkelerinde de endemik olmasa da KPC hakimiyeti vardır. Avustralya kıtasında NDM önemli salgınlar yapmış ve bölgesel yayılım göstermiştir. IMP ve KPC ikinci ve üçüncü sıklıkta bulunmaktadır. Asya kıtasına bakıldığında Japonya ve Tayvan'da IMP'nin, Bangladeş ve Hindistan'da NDM'nin, Çin'de KPC ve NDM'nin endemik olduğu görülmektedir. Güney Kore ve Tayvan'da VIM bölgesel yayılım fırsatı bulmuştur. İsrail'de KPC'nin endemik, Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan ve Irak'ta NDM'nin, Lübnan'da ise OXA-48'in bölgesel yayılımı olduğu gözlenmektedir. Afrika kıtasında OXA-48'in Fas'ta endemik, Senegal'de bölgesel yayıldığı bildirilmiştir. Kenya ve Mısır'da NDM hakimiyeti görülmektedir. Avrupa kıtasında Yunanistan IMP, KPC ve VIM bakımından, Malta OXA-48 bakımından ve İtalya KPC bakımından endemiktir. Almanya ve Fransa'da KPC

ve OXA-48, İspanya'da bunların yanında ek olarak VIM de bölgesel yayılıma sahip olmuştur. İngiltere ve Belçika'da KPC, NDM, OXA-48 ve VIM bölgesel yayılıma sahip olup önemli salgınlar yapmıştır. Norveç ve Polonya'da KPC yayılımı ön plandadır. Hollanda'da NDM ve OXA-48 ağırlıklı olarak görülmektedir. Türkiye OXA-48'in tanımlandığı ilk ülke olarak OXA-48 endemisindedir. Diğer 4 karbapenamaz geni de ülkemizde çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (129).

Grundmann ve ark.'nın (130) 2016'da yayımlanan ve Avrupa Karbapenamaz Üreten *Enterobacteriaceae* Sürveyansı (EuSCAPE) programı verilerini incelediği çalışmasında Avrupa'nın çeşitli ülkelerinden Kasım 2013-Nisan 2014 arasında toplanan 1203 karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* yer almıştır. Suşların 850'sinin (%70,7) en sık görülen 4 karbapenamaz geninden (KPC, NDM, VIM, OXA-48) en az birine sahip olduğu ve 353'ünün (%29,3) bu genler dışında bir gene sahip olduğu veya diğer mekanizmalara bağlı karbapeneme direnç geliştirdiği görülmüştür. 850 karbapenamaz üreten *K. pneumoniae*'da en sık görülen 4 karbapenamaz geninin sıklıkları belirlenmiştir. Çalışmada KPC %31,5, NDM %7,7, VIM %5,7 ve OXA-48 %25,8 oranında bulunmuştur. İtalya'nın en çok izolat gönderen ülke olması ve izolatlarının %95,9'unun KPC pozitif olması KPC'nin birinci sırada olmasında etkindir. Sürveyansa Türkiye'den 17 hastanenin katıldığı 124 karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* dahil edilmiş ve suşların 112'sinde (%90,3) 4 direnç geninden biri saptanmıştır. Çalışmada NDM %7,3, VIM %4 ve OXA-48 %79, diğer genlere veya mekanizmalara bağlı direnç gelişimi ise %9,7 olarak bulunmuştur. KPC ve IMP saptanmamıştır.

Kazmierczak ve ark.'nın (131) 2012-2017 yıllarını kapsayan meropenem duyarlı olmayan *Enterobacterales* global sürveyans programı verilerini incelediği çalışmasında 5 coğrafik bölgeden 39 ülkenin izolatları değerlendirilmiştir. 2.666 meropenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae* izolatı karbapenamaz direnç geni bakımından değerlendirilmiştir. Türkiye'nin de dahil olduğu Avrupa kıtasında 1102 karbapenamaz üreten *K. pneumoniae*'nın %54,3'ü KPC, %31,4'ü OXA-48, %8,1'i NDM, %3,7'si VIM olarak saptanmıştır. IMP pozitif izolat bildirilmemiştir. Latin Amerika bölgesinde 430 karbapenamaz üreten *K. pneumoniae*'da %92,3 KPC, %5,5 NDM, %0,6 VIM pozitifliği saptanmıştır. IMP ve OXA-48 pozitif izolat bildirilmemiştir. Asya/Pasifik bölgesinden 146 karbapenamaz üreten *K. pneumoniae*'da %32,1 KPC, %3,4 OXA-48, %11,6 IMP, %40,4 NDM pozitifliği olup VIM pozitif izolata rastlanmamıştır. Orta Doğu/Afrika bölgesinden 87 karbapenamaz üreten *K. pneumoniae*'da %21,8 KPC, %5,7 OXA-48,

%39 NDM, %1,1 VIM pozitif izolat saptanmış olup IMP üreten suşa rastlanmamıştır. Kuzey Amerika'dan 70 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da %95,7 KPC, %2,8 NDM saptanmış olup diğer üç gene sahip izolat bildirilmemiştir.

Literatürden karbapenemaz direnç genlerinin dünya genelinde güncel dağılımlarına bakıldığında; Emeraud ve ark.'nın (132) Fransa'da 2019-2021 yılları arasındaki karbapenemaz direnç genlerini araştırdığı çalışmada 2.511 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da OXA-48 %45,2, NDM %14,9, KPC %6, VIM %1,4 olarak bulunmuştur. En az iki gene sahip izolat oranı ise %3,2 olarak bildirilmiştir. Çalışmada IMP geni hedeflenmemiştir. İlk iki sıranın OXA-48 ve NDM olmasıyla, iki gene sahip izolat oranıyla bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Onorato ve ark. (133) tarafından İtalya'da 2020 yılında izole edilen 154 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da KPC %72,7, VIM %11, OXA-48 %2,6, NDM %1,3, IMP %0,6 oranında saptanmış, örneklerin %11'inde araştırılan karbapenemaz genlerine rastlanmamıştır. Araştırılan 5 direnç geninin tespit edilemediği izolat oranı bakımından bizim çalışmamızdaki %9'luk oranla benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu çalışma en sık izole edilen kültür türleri bakımından ilk üç sıranın her ne kadar sıralaması değişse de kan, idrar ve solunum yolu örnekleri olmasıyla bizim çalışmamızla ortak yönleri sahiptir.

García-Castillo ve ark.'nın (134) çalışmada İspanya'da 2016 yılında izole edilen 166 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da %89,1 OXA-48, %7,8 KPC, %1,8 VIM, %1,2 NDM pozitifliği saptanmış olup IMP pozitif izolata rastlanmamıştır. OXA-48'in belirgin hakimiyeti ve IMP pozitif izolata rastlanmaması bakımından bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Castanheira ve ark.'nın (135) ABD'de 2016-2020 yılları arasında 86 hastaneden izole edilen 195 karbapenem duyarlı olmayan *K. pneumoniae*'da yaptığı çalışmada KPC %80, NDM %1,5, OXA-48 %0,5 bildirilmiştir. VIM ve IMP pozitif izolata rastlanmamıştır. Suşların %15,8'inde araştırılan direnç genlerinin hiçbirine rastlanmamıştır. VIM ve IMP'e rastlanmaması ve PCR'in negatiflik yüzdesi bakımından bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Pourgholi ve ark.'nın (136) İran'da 2014-2018 yılları arasındaki karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarını içeren çalışmada 71 izolatın %67,6'sı OXA-48, %39,4'ü VIM, %26,8'i IMP, %18,3'ü NDM, %7'si KPC olarak bulunmuş ve suşların

%12,6'sında araştırılan direnç genlerinin hiçbiri saptanmamıştır. Örneklerin izole edildiği kültürlerle bakıldığında %35,2 idrar, %35,2 trakeal aspirat, %8,5 kan olduğu görülmüştür. Bizim çalışmamızda da örneklerin çoğu (%92) idrar, kan ve trakeal aspirat kültürlerinden izole edilmiştir. PCR'ın negatiflik yüzdesi bakımından da çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Ramadan ve ark.'nın (137) 2020-2021 yılları arasında Mısır'da 52 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* üzerinde yaptığı çalışmada KPC %11,5, NDM %32,7, OXA-48 %19,2, OXA-48 + NDM %17,3 olarak saptanmış olup VIM ve IMP hiçbir izolatta saptanmamıştır. Suşların %19,2'sinde ise araştırılan direnç genlerinin hiçbiri saptanmamıştır. Mısır'dan başka bir çalışma El-Kady ve ark. (138) tarafından 2020-2021 yılları arasında 47 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da yapılmıştır. Çalışmada KPC %42,6, OXA-48 %23,4, NDM %10,6, IMP %2,1, OXA-48 + NDM %12,7, KPC + NDM %4,3, KPC + IMP %4,3 olarak saptanmış olup VIM pozitif örneğe rastlanmamıştır.

Fu ve ark.'nın (139) Çin'de 2016-2021 yılları arasında 320 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da yaptığı çalışmada NDM %52,6, KPC %45,1 ve IMP %2,3 oranında saptanmış, VIM ve OXA-48 üreten suş bulunmamıştır. Klinik örneklerle göre bakıldığında bizim çalışmamızda olduğu gibi örneklerin büyük çoğunluğunun (%86,9) alt solunum, idrar ve kandan izole edildiği görülmüştür. Çin'den başka bir çalışmada Han ve ark. (140) 2016-2018 yılları arasında izole edilen 709 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da KPC %64,5, NDM %21,1, IMP %1,2 ve OXA-48 %0,3 oranlarını bildirmiştir. Örneklerin %2,3'ünde araştırılan direnç genleri saptanmamıştır. Çin ve Mısır'dan yapılan bu çalışmalar, karbapenemaz direnç genlerinin dağılımının sadece ülke/bölge bazında değil, aynı ülkeden yakın tarihli yapılan çalışmalar da bile farklı olabileceğini göstermektedir.

Türkiye'de *K. pneumoniae*'da karbapenemaz direnç genlerinin dağılımını inceleyen çalışmalara bakıldığında; Çakar ve ark. (141) Türkiye'de 2014'te 18 merkezden toplanan 134 *K. pneumoniae*'da OXA-48 %83,1, NDM %6,5, VIM %3,2, IMP %1,6, OXA-48 + NDM %2,4, OXA-48 + VIM %2,4, VIM + NDM %0,8 sonuçlarını bildirmiştir. KPC pozitif izolat tespit edilmemiştir. Çalışılan izolatların %7,5'inde araştırılan direnç genlerine rastlanmamıştır.

Çalık ve ark.'nın (142) çalışmasında İstanbul'da 2020-2021 yılları arasında izole edilen 98 *K. pneumoniae* suşunda OXA-48 + NDM %43, OXA-48 %38, KPC %7, NDM

%2, KPC + OXA-48 %1 olarak saptanmıştır. VIM ve IMP hiçbir izolatta bulunmamıştır. Suşların %7'sinde araştırılan hiçbir direnç geni saptanmamıştır. Sağıroğlu ve ark.'nın (143) 2014-2016 yılları arasında İstanbul'da 102 *K. pneumoniae*'da yaptığı çalışmada OXA-48 %39,2, NDM %52,9, OXA-48 + NDM %5,8, KPC %1,9 oranında saptanmıştır. VIM ve IMP tespit edilmemiştir. Durmuş ve ark. (144) İstanbul'da 2015-2017 yılları arasında 87 *K. pneumoniae*'da %68,9 OXA-48/OXA-162, %22,9 NDM, %1,1 KPC, %5,7 OXA-48/OXA-162 + NDM oranlarını bildirmiştir. VIM ve IMP rastlanmamış, %1,1 suшта araştırılan direnç genlerine rastlanmamıştır. Erdem ve ark. (145) İstanbul'da 2012-2016 yılları arasında 50 *K. pneumoniae*'da %86 OXA-48, %14 NDM pozitifliği bildirmiştir. VIM, IMP ve KPC genleri saptanmamıştır. İstanbul'da yapılan bu çalışmalara bakıldığında NDM'nin yıllar geçtikçe artması dikkat çekmektedir. Öyle ki OXA-48'in endemik olduğu Türkiye'de ilk defa bir çalışmada NDM'nin oranının daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Ayrıca İstanbul'da yıllar geçtikçe OXA-48 + NDM oranlarında artış olduğu görülmektedir.

Hoşbul ve ark.'nın (146) yapmış olduğu çalışmada Ankara'da 2018-2021 yılları arasında izole edilen 150 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşunda OXA-48 %71,3, KPC %16,7, NDM %4,7, OXA-48 + KPC %6,7, OXA-48 + NDM %0,7 olarak bulunmuş olup VIM ve IMP üreten izolat saptanmamıştır. Zarakolu ve ark.'nın (147) çalışmasında 2017-2018 yılları arasında Ankara, Bursa ve Trabzon'da kan dolaşımı enfeksiyonuyla ilişkili 131 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da direnç oranları OXA-48 %62,5, KPC %10,6, NDM %9,1, VIM %3,8, OXA-48 + NDM %6,8, OXA-48 + NDM + KPC %0,7, OXA-48 + IMP %0,7, NDM + KPC + VIM %1,5, NDM + KPC %2,2, VIM + IMP %1,5 olarak saptanmıştır. Bıçakçıgil ve ark.'nın (148) 2016-2018 yılları arasında Ankara'da 132 *K. pneumoniae*'daki oranları OXA-48 %86,3, NDM %3,8, OXA-48 + NDM %6,1, OXA-48 + VIM %3,8 olarak bildirilmiş, KPC ve IMP pozitifliği saptanmamıştır. Baran ve ark. (149) 2013-2014 yılları arasında Ankara'da 69 *K. pneumoniae*'da yaptığı çalışmada OXA-48 %75,3, NDM %7,2, VIM %1,4 oranlarını bildirmiştir. KPC ve IMP pozitifliği gözlenmemiştir. Örneklerin %15,9'unda araştırılan direnç genleri saptanmamıştır. Kutlu ve ark. (150) Ankara'da 2010-2014 yılları arasında toplanan 79 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'da %81 OXA-48, %6,3 VIM, %2,5 NDM, %5,1 OXA-48 + VIM oranlarını bildirmiştir. KPC ve IMP pozitifliği saptanmamıştır.

Yaşar ve ark.'nın (151) çalışmasında İzmir'de 2017-2019 yılları arasında 65 *K. pneumoniae*'da OXA-48 %70,7, NDM %6,1, KPC %6,1, OXA-48 + NDM %16,9

bildirilmiş, VIM ve IMP saptanmamıştır. Bilik ve ark. (152) 2016-2017 yılları arasında Şanlıurfa'da 74 *K. pneumoniae*'da %78,3 OXA-48, %4 NDM, %8,1 OXA-48 + NDM, %1,3 OXA-48 + VIM + IMP oranlarını bildirmiştir. KPC pozitifliği saptanmamıştır. Suşların %8,1'inde PCR negatif saptanmıştır. Genç ve ark.'nın (153) 2015-2017 yılları arasında Kocaeli'de izole ettiği 100 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'da direnç dağılımlarına bakıldığında OXA-48 %51, NDM %9, KPC %6, OXA-48 + NDM %25, KPC + NDM %2, OXA-48 + KPC %1, VIM + NDM %1 olarak bulunmuş, IMP hiçbir izolatta saptanmamıştır. Suşların %5'inde araştırılan direnç genlerinin hiçbirine rastlanmamıştır. Özdemir ve ark. (154) Malatya'da 2012-2014 yılları arasındaki 70 *K. pneumoniae*'da OXA-48 %67,1, NDM %10, VIM %4,2, OXA-48 + NDM %5,7 oranlarını saptamıştır. KPC ve IMP bildirilmemiştir. Suşların %12,8'inde PCR negatif sonuçlanmıştır. Su ve ark. (155) 2010-2015 yılları arasında Antalya'da 107 *K. pneumoniae*'da OXA-48 %83,1, NDM %1,8 saptanmış, VIM, IMP ve KPC pozitifliği bildirilmemiştir.

Türkiye'den yapılan çalışmalar üzerine genel bir değerlendirme yapıldığında NDM'nin tek başına ve OXA-48 ile kombine halde en sık görüldüğü İstanbul'da yapılan iki çalışma hariç OXA-48'in belirgin hakimiyeti söz konusudur. NDM çalışmalarının çoğunda ikinci sıklıkta gözlenmekte ve sıklığı %1,8 ila %52,9 arasında değişkenlik göstermektedir. IMP tek başına en yüksek %1,6, VIM tek başına en yüksek %6,3, KPC tek başına en yüksek %10,6 oranında saptanmış olup KPC, VIM, IMP pozitifliği saptanmayan birçok çalışma olduğu görülmektedir. Birden fazla gene sahip izolatlarda en sık birlikteliğin OXA-48 + NDM olduğu görülmektedir. 5 direnç geninin hiçbirinin tespit edilememesi en yüksek %15,9 oranında bildirilmiştir. Tüm bu sonuçlar birlikte değerlendirildiğinde, bizim çalışmamız karbapenemaz direnç genlerinin dağılımına bakıldığında Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarla uyumlu gözükmektedir.

Literatürde KDT'nin PCR ile karşılaştırıldığı çalışmalara bakıldığında; Hoang ve ark.'nın (156) çalışmasında %38 NDM pozitifliği içeren 50 *K. pneumoniae*'da NDM için KDT'nin duyarlılığı %90,5, özgüllüğü %100, pozitif prediktif değeri %100, negatif prediktif değeri %93,6 olarak saptanmış olup bizim çalışmamızdaki sonuçlarla oldukça benzerlik göstermektedir. Li ve ark. (157) 39 MBL pozitif *Enterobacterales*'te KDT'nin duyarlılığını %97,6, özgüllük ve pozitif prediktif değerini %100, negatif prediktif değerini %98,4 olarak bildirmiştir. Bu sonuçların bizim çalışmamızdaki oranlara oldukça yakın olduğu görülmektedir.

Shaker ve ark.'nın (158) çalışmasında 50 *Enterobacterales*'te KDT'nin OXA-48 için duyarlılık, özgüllük, pozitif prediktif değer ve negatif prediktif değerleri sırasıyla %97,9, %50, %97,95 ve %73,95 olarak bildirilmiştir. Bizim çalışmamızdaki OXA-48 değerleri ile kıyaslandığında duyarlılık, özgüllük ve pozitif prediktif değer oranlarıyla büyük benzerlik göstermektedir. Aynı çalışmada MBL için değerler sırasıyla %87, %75, %97,5 ve %33 bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise MBL için tüm oranlar %100 saptanmış olup özellikle negatif prediktif değer bakımından ciddi bir fark gözlenmiştir. Çalışmada birden fazla gene sahip izolat oranı %80 saptanmıştır. KDT'nin PCR ile genel karşılaştırılmasında duyarlılık %82,1, pozitif prediktif değer %91,6 bulunmuş olup duyarlılığın bizim çalışmamızdakinden çok ciddi bir fark olmasa da daha az bulunduğu görülmektedir. Birden fazla gene sahip izolatların KDT ile değerlendirilmesi değerlerin düşük çıkmasında önemli bir etkidir. Özellikle OXA-48 ile olan kombinasyonlar bizim çalışmamızdaki iki OXA-48 + NDM pozitif izolatın KDT ile OXA-48 benzeri pozitif yorumlanması düşünüldüğünde, direnç kombinasyonun OXA-48 haricindeki genlerini saptamasında KDT'nin başarısını düşürmektedir.

Bartolini ve ark.'nın (159) 93'ü *K. pneumoniae* olan 101 karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'te KDT ile PCR sonuçlarını karşılaştırdığı çalışmasında çoğunluğun (%86,1) KPC olduğu örneklerde KDT'nin duyarlılığı %95, özgüllüğü %99 olarak saptanmıştır. KPC + VIM içeren 3 izolatın hepsinde KDT sonucu OXA-48 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki duyarlılık sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Ayrıca iki gene sahip izolatların OXA-48 benzeri olarak yanlış yorumlanması ile de bizim sonuçlarımızla uyumluluk göstermektedir.

Sattler ve ark.'nın (160) 106 karbapenemaz üreten ve 47 karbapenemaz negatif toplam 153 *Enterobacterales*'te yaptığı çalışmada 3 farklı firmanın KDT yöntemi kullanılmış ve her biri PCR ile kıyaslanmıştır. 19 KPC, 48 MBL, 6 OXA-48 pozitif izolat içeren çalışmada iki kitte duyarlılık %86, özgüllük %98, diğer kitte duyarlılık %96, özgüllük %87 saptanmıştır. MBL için kitlerin duyarlılığı %94, %67 ve %94 olarak saptanmıştır. MBL için duyarlılığın %67 saptandığı kite bakıldığında 17 MBL pozitif *K. pneumoniae*'da duyarlılığın %82,3, sadece NDM baz alındığında 11 NDM pozitif izolatta duyarlılığın %90,9 olduğu görülmektedir. OXA-48 için duyarlılıklar %100, %83 ve %100 olarak bulunmuştur. Hem genel hem de genotip bazında duyarlılıklar bizim çalışmamızla karşılaştırıldığında oldukça benzerlik görülmektedir. İki direnç genine sahip 3 örneğin 2'sinde ise KPC + VIM birlikteliği bulunan izolatlar bir kit ile yalancı

negatif, diğeri iki kit ile OXA-48 pozitif olarak yorumlanmıştır. Bu bakımdan da bizim çalışmamızla uyumlu görülmektedir. Çalışmada PCR ile OXA-48 saptanmayan ancak OXA-48 benzeri genotipe sahip olan 17 izolatın 16'sı her üç kitte KDT ile OXA-48 benzeri pozitif olarak, geriye kalan bir izolat ise iki kitle OXA-48 benzeri pozitif olarak bulunmuştur. Bu durum bizim çalışmamızdaki PCR'ı negatif ancak KDT ile OXA-48 benzeri pozitif saptanan 9 izolatın OXA-48 benzeri genler için de PCR uygulanması durumunda KDT'nin özgüllüğünün artabileceğini düşündürmektedir.

Doyle ve ark. (122) 114 karbapenemaz üreten ve 28 karbapenemaz negatif toplam 142 *Enterobacterales*'te iki farklı KDT kiti kullanmış ve kitlerin duyarlılıkları %78 ve %80 saptanmıştır. Kitlerin OXA-48'i saptamaya yönelik temosilin diski içermemesinden dolayı 14 OXA-48'teki başarısızlığı duyarlılığın az bulunmasında etken olmuştur. 27 NDM pozitif izolatta her iki kitte de tıpkı bizim çalışmamızda olduğu gibi %100 duyarlılık ve %100 özgüllük saptanmıştır.

Hojabri ve ark. (161) 20'si *K. pneumoniae* olan 27 NDM üreten *Enterobacterales*'te KDT'nin NDM için duyarlılığını %92,5, özgüllüğünü %100 bulmuştur. NDM + OXA-48 birlikteliği gösteren iki *K. pneumoniae* KDT ile OXA-48 benzeri olarak yorumlanmıştır. Bu bulgular bakımından bizim çalışmamızla uyumluluk göstermektedir. 39 OXA-48 üreten *Enterobacterales*'te ise duyarlılığın %58,5, özgüllüğün %100 olması dikkat çekicidir. Ancak duyarlılığın düşük olmasına *K. pneumoniae* haricindeki izolatların sebep olduğu görülmektedir. Ayrıca çalışmada NDM + OXA-48 üreten izolatların çoğunluğunun KDT ile MBL saptanmış olmasının da duyarlılığın düşmesinde etkili olduğu söylenebilir. KDT ile negatif ancak PCR ile OXA-48 saptanan 31 örneğin çoğunluğunun imipenem/meropeneme duyarlı olması, OXA-48'in karbapenemleri hidroliz etme yeteneğinin göreceli düşük olması bilgisi doğrultusunda PCR'ın karbapeneme duyarlı izolatlarda KDT yerine kullanımının önemini göstermektedir. Ayrıca PCR negatif örneklerin çoğunluğunun imipenem/meropeneme duyarlı olması ve KDT'nin de bu tip örneklerde negatif sonuçlanması özgüllüğün bizim çalışmamızdaki %54,1'lik orandan yüksek olmasını açıklayabilir.

Giske ve ark. (162) 2 farklı KDT ile yaptığı çalışmada 25 MBL pozitif *K. pneumoniae*'da KDT'lerden birinin duyarlılık ve özgüllüğünü %100, diğeri duyarlılık ve özgüllüğünü sırasıyla %100 ve %98 olarak bildirmiştir. Bu oranlarla bizim

çalışmamızın oranları birbirine oldukça yakındır. Çalışmada temosilin diski kullanılmadığı için KDT'ler OXA-48 olarak yorumlanamamıştır ancak 9 OXA-48'in hiçbiri DPA ve/veya kloksasilinle sinerji göstermemiş, bir izolatta aminofenilboronik asitle sinerji saptanmıştır. Bu verilerle OXA-48 için değerlendirme her ne kadar kısıtlı olsa da bizim çalışmamızdaki OXA-48 üreten izolatların hiçbirinin DPA, kloksasilin ve/veya boronik asitle sinerji göstermemesi bakımından benzerlik görülmektedir.

Ohsaki ve ark. (163) 14'ü *K. pneumoniae* olan 22 karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'te KDT'nin duyarlılığını bizim çalışmamızda olduğu gibi %100 olarak bildirmiştir. Karbapenemaz üretmeyen suşlarla birlikte toplam 45 izolatta KDT'nin özgülüğü %91,1 olarak saptanmıştır. Çalışmada ayrıca PCR ile OXA-181 saptanan iki izolat KDT ile OXA-48 benzeri fenotipinde saptanmıştır. Bizim çalışmamızda PCR'ın OXA-48 negatif bulunduğu 9 örneğin KDT ile OXA-48 benzeri pozitif saptanması, KDT'nin özgülüğünün düşük olarak yorumlanmasından önce PCR ile OXA-48 benzeri genlerin araştırılmasının gerekliliğini göstermektedir.

Sakanashi ve ark. (164) 44 MBL pozitif *Enterobacterales*'te yaptığı çalışmada KDT'nin duyarlılığını %34 bildirmişlerdir. MBL'lerin çoğunluğunun (%90,9) IMP olması ve IMP için duyarlılığın %28 olması genel duyarlılığın düşük olmasında etken olarak gözükmemektedir. 4 NDM pozitif izolatın hepsi KDT ile MBL olarak raporlanıp NDM için duyarlılık bizim çalışmamızda olduğu gibi %100 olarak saptanmıştır. 11 MBL negatif örneğin hepsi KDT ile de negatif bildirilmiş olup özgülük bizim çalışmamızdaki %100 değeriyle aynı bildirilmiştir.

Dortet ve ark. (165) 124 *Enterobacterales*'te KDT'nin genel duyarlılığını %95,8, 35'i MBL pozitif 117 *Enterobacterales*'te ise KDT'nin duyarlılık ve özgülüğünü %100 olarak bildirmiştir. Bizim çalışmamızdaki oranlarla kıyaslandığında sonuçların çok yakın olduğu görülmektedir.

Pantel ve ark. (166) 83'ü karbapenemaz üreten, 72'si karbapenemaz negatif toplam 155 *Enterobacterales*'te yaptığı çalışmada KDT'nin duyarlılığını %98,8, özgülüğünü %93,1 bildirmiştir. 52 OXA-48 pozitif izolat için duyarlılık %100, özgülük %97, 18 MBL pozitif izolat için duyarlılık %94,4, özgülük %99,2 saptanmıştır. Van Dijk ve ark. (167) 99'u karbapenemaz üreten, 29'u karbapenemaz negatif toplam 128 *Enterobacterales*'te yaptığı çalışmada 31 MBL pozitif izolat saptamış ve MBL için KDT'nin duyarlılığını %90, özgülüğünü %96 bildirmiştir. 27 OXA-48 pozitif için

duyarlılık ve özgülüğü %100 olarak bildirmişlerdir. Türkiye'den KDT ve PCR yöntemlerinin karşılaştırıldığı ilk çalışmada Çakar ve ark. (141) 124'ü *K. pneumoniae* olan 143 karbapenemaz üreten *Enterobacterales*'te KDT'nin hem genel hem de MBL ve OXA-48 için duyarlılık ve özgülüğünü %100 bildirmiştir. Bu üç çalışma bizim çalışmamızla kıyaslandığında KDT'nin genel duyarlılığı, MBL'nin duyarlılık ve özgülüğü, OXA-48'in duyarlılığı bakımından oldukça benzerdir. Üç çalışmada da OXA-48'in özgülüğü bizim çalışmamızdaki değerden yüksek bulunmuştur. Çalışmamızda karbapenemaz üretmeyen suşların yer almaması ve PCR ile OXA-48 benzeri genlerin araştırılmaması özgülüğün düşük olmasını açıklayabilir.



6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Karbapenemaz direnç genlerinin tiplerinin ve sıklığının belirlenmesi hem epidemiyolojik olarak hem de doğru antibiyotik seçimini etkilemesinden dolayı büyük bir öneme sahiptir. Çalışmamız ilimizde bu amaç doğrultusunda yapılmış ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır ve direnç genlerinin dağılımı Türkiye'den yapılan birçok çalışmayla uyumlu bulunmuştur.

Karbapenemaz tipinden bağımsız olarak sadece karbapenemaz varlığını saptama bakımından KDT laboratuvarlarda güvenle kullanılabilir.

Sadece NDM pozitif örnekler için KDT mükemmel sonuç vermektedir. OXA-48 pozitif örnekler için KDT'nin özgülüğünün düşük olması göz önünde bulundurularak kullanılması düşünülebilir.

KDT ile birden fazla gene sahip izolatların doğru değerlendirilmesi zorluk teşkil etmektedir. Özellikle OXA-48'in içinde olduğu direnç kombinasyonlarında KDT'nin OXA-48 harici genleri saptama ihtimali düşmektedir.

PCR'ın negatif, KDT'nin OXA-48 benzeri pozitif olarak sonuçlandığı durumlarda PCR ile OXA-48 benzeri genlerin de hedeflenmesi gerekmektedir. Aksi halde KDT'nin özgülüğünün düşük saptanması muhtemeldir.

Sonuç olarak KDT, uygun maliyetli ve uygulama kolaylığı olması bakımından genotipik testlere alternatif olabilir. Ayrıca karbapenemaz direnç mekanizmasını da tespit edebilme özelliğinden dolayı diğer birçok fenotipik yöntemle kıyasla önemli bir avantaja sahiptir.

7. KAYNAKLAR

1. Gonzalez-Ferrer S, Peñaloza HF, Budnick JA, Bain WG, Nordstrom HR, Lee JS et al. Finding Order in the Chaos: Outstanding Questions in *Klebsiella pneumoniae* Pathogenesis. *Infect Immun*. 2021;89(4):e00693-20.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603.
3. Alcántar-Curiel MD, Girón JA. *Klebsiella pneumoniae* and the pyogenic liver abscess: implications and association of the presence of *rpmA* genes and expression of hypermucoviscosity. *Virulence*. 2015;6(5):407-409.
4. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41(3):252-275.
5. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020;25(6):1340.
6. Wang X, Zhang Y, Li C, Li G, Wu D, Li T et al. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* and *Enterococcus* spp. isolated from the feces of giant panda. *BMC Microbiol*. 2022;22(1):102.
7. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131-139.

8. Bassetti M, Righi E, Carnelutti A, Graziano E, Russo A. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2018;16(10):749-761.
9. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm!. *Trends Mol Med.* 2012;18(5):263-272.
10. Belati A, Bavaro DF, Diella L, De Gennaro N, Di Gennaro F, Saracino A. Meropenem/Vaborbactam Plus Aztreonam as a Possible Treatment Strategy for Bloodstream Infections Caused by Ceftazidime/Avibactam-Resistant *Klebsiella pneumoniae*: A Retrospective Case Series and Literature Review. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(3):373.
11. Zhong H, Wu ML, Feng WJ, Huang SF, Yang P. Accuracy and applicability of different phenotypic methods for carbapenemase detection in *Enterobacteriaceae*: A systematic review and meta-analysis. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020;21:138-147.
12. Zhou M, Wang D, Kudinha T, Yang Q, Yu S, Xu YC. Comparative Evaluation of Four Phenotypic Methods for Detection of Class A and B Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in China. *J Clin Microbiol.* 2018;56(8):e00395-18.
13. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(3):487-489.
14. Grimont, Patrick AD, Francine Grimont. *Klebsiella*. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* 2015: 1-26.
15. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov.,

Yersiniaceae fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2016;66(12):5575-5599.

16. Dong N, Yang X, Chan EW, Zhang R, Chen S. *Klebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. EBioMedicine. 2022;79:103998.
17. Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344-359.
18. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex. Nat Commun. 2021;12(1):4188.
19. Jorgensen JH, Pfaller MA. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Forsythe SJ, Abbott SL, Pitout J, editors. Manual of Clinical Microbiology. 11th edition. Washington, DC: ASM Press; 2015. pp. 714-738.
20. Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL. *The Enterobacteriaceae*. Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 7th edition. Philadelphia: Wolters Kluwer Health; 2017. pp. 213-315.
21. Khaertynov KS, Anokhin VA, Rizvanov AA, Davidyuk YN, Semyenova DR, Lubin SA et al. Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis. Front Med (Lausanne). 2018;5:225.
22. Zhu J, Wang T, Chen L, Du H. Virulence Factors in Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2021;12:642484.

23. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clin Microbiol Rev. 2019;32(3):e00001-19.
24. Ali S, Alam M, Hasan GM, Hassan MI. Potential therapeutic targets of *Klebsiella pneumoniae*: a multi-omics review perspective. Brief Funct Genomics. 2022;21(2):63-77.
25. Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the Accessory Genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4.
26. Guerra MES, Destro G, Vieira B, Lima AS, Ferraz LFC, Hakansson AP et al. *Klebsiella pneumoniae* Biofilms and Their Role in Disease Pathogenesis. Front Cell Infect Microbiol. 2022;12:877995.
27. Arato V, Raso MM, Gasperini G, Berlanda Scorza F, Micoli F. Prophylaxis and Treatment against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. Int J Mol Sci. 2021;22(8):4042.
28. Follador R, Heinz E, Wyres KL, Ellington MJ, Kowarik M, Holt KE et al. The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. Microb Genom. 2016;2(8):e000073.
29. Piperaki ET, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J. 2017;36(10):1002-1005.
30. Balestrino D, Ghigo JM, Charbonnel N, Haagsen JA, Forestier C. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. Environ Microbiol. 2008;10(3):685-701.

31. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine NM, De la Cruz MA et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*. 2013;4(2):129-138.
32. Khater F, Balestrino D, Charbonnel N, Dufayard JF, Brisse S, Forestier C. In silico analysis of usher encoding genes in *Klebsiella pneumoniae* and characterization of their role in adhesion and colonization. *PLoS One*. 2015;10(3):e0116215.
33. Struve C, Bojer M, Krogfelt KA. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infect Immun*. 2008;76(9):4055-4065.
34. Brown JS, Holden DW. Iron acquisition by Gram-positive bacterial pathogens. *Microbes Infect*. 2002;4(11):1149-1156.
35. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007;71(3):413-451.
36. Brock JH, Williams PH, Licéaga J, Wooldridge KG. Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms. *Infect Immun*. 1991;59(9):3185-3190.
37. Russo TA, Olson R, Fang CT, Stoesser N, Miller M, MacDonald U et al. Identification of Biomarkers for Differentiation of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from Classical *K. pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2018;56(9):e00776-18.
38. Russo TA, Olson R, Macdonald U, Metzger D, Maltese LM, Drake EJ et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting

- conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. Infect Immun. 2014;82(6):2356-2367.
39. Lawlor MS, O'connor C, Miller VL. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. Infect Immun. 2007;75(3):1463-1472.
40. Chan YR, Liu JS, Pociask DA, Zheng M, Mietzner TA, Berger T et al. Lipocalin 2 is required for pulmonary host defense against *Klebsiella* infection. J Immunol. 2009;182(8):4947-4956.
41. Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun. 2011;79(8):3309-3316.
42. Fischbach MA, Lin H, Zhou L, Yu Y, Abergel RJ, Liu DR et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103(44):16502-16507.
43. Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. J Infect Dis. 2008;197(12):1717-1727.
44. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008;62(1):1-6.
45. Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee HC, Ke DS, Lee CC et al. Association between *rmpA* and *magA* genes and clinical syndromes caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. Clin Infect Dis. 2006;42(10):1351-1358.

46. Yang X, Sun Q, Li J, Jiang Y, Li Y, Lin J et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):841-849.
47. Pomakova DK, Hsiao CB, Beanan JM, Olson R, MacDonald U, Keynan Y et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012;31(6):981-989.
48. Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *J Intern Med.* 2020;287(3):283-300.
49. Ko WC, Paterson DL, Sagnimeni AJ, Hansen DS, Von Gottberg A, Mohapatra S et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(2):160-166.
50. Magill SS, Edwards JR, Bamberg W, Beldavs ZG, Dumyati G, Kainer MA et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections [published correction appears in *N Engl J Med.* 2022 Jun 16;386(24):2348]. *N Engl J Med.* 2014;370(13):1198-1208.
51. Lin YT, Jeng YY, Chen TL, Fung CP. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001-2008. *BMC Infect Dis.* 2010;10:307.
52. Echols RM, Tosiello RL, Haverstock DC, Tice AD. Demographic, clinical, and treatment parameters influencing the outcome of acute cystitis. *Clin Infect Dis.* 1999;29(1):113-119.

53. Laupland KB, Ross T, Pitout JD, Church DL, Gregson DB. Community-onset urinary tract infections: a population-based assessment. *Infection*. 2007;35(3):150-153.
54. Linhares I, Raposo T, Rodrigues A, Almeida A. Frequency and antimicrobial resistance patterns of bacteria implicated in community urinary tract infections: a ten-year surveillance study (2000-2009). *BMC Infect Dis*. 2013;13:19.
55. Meatherall BL, Gregson D, Ross T, Pitout JD, Laupland KB. Incidence, risk factors, and outcomes of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Am J Med*. 2009;122(9):866-873.
56. Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, Mathers AJ, van Duin D, Clancy CJ. Infectious Diseases Society of America Antimicrobial-Resistant Treatment Guidance: Gram-Negative Bacterial Infections. Infectious Diseases Society of America 2022; Version 1.1. Available at <https://www.idsociety.org/practice-guideline/amr-guidance/>. Accessed 24 Nov 2022.
57. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016;6(8):a025247.
58. Kahan JS, Kahan FM, Goegelman R, Currie SA, Jackson M, Stapley EO et al. Thienamycin, a new beta-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *J Antibiot (Tokyo)*. 1979;32(1):1-12.
59. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*. 2017;131:185-195.
60. O'Donnell JN, Miglis CM, Lee JY, Tuvell M, Lertharakul T, Scheetz MH. Carbapenem susceptibility breakpoints, clinical implications with the moving target. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2016;14(4):389-401.

61. Shah PM, Isaacs RD. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(4):538-542.
62. Scheetz MH, Wunderink RG, Postelnick MJ, Noskin GA. Potential impact of vancomycin pulmonary distribution on treatment outcomes in patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia. *Pharmacotherapy.* 2006;26(4):539-550.
63. Jaruratanasirikul S, Thengyai S, Wongpoowarak W, Wattanavijitkul T, Tangkitwanitjaroen K, Sukarnjanaset W et al. Population pharmacokinetics and Monte Carlo dosing simulations of meropenem during the early phase of severe sepsis and septic shock in critically ill patients in intensive care units. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):2995-3001.
64. Lomaestro BM, Drusano GL. Pharmacodynamic evaluation of extending the administration time of meropenem using a Monte Carlo simulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):461-463.
65. Wittau M, Scheele J, Kurlbaum M, Brockschmidt C, Wolf AM, Hemper E et al. Population Pharmacokinetics and Target Attainment of Meropenem in Plasma and Tissue of Morbidly Obese Patients after Laparoscopic Intraperitoneal Surgery. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):6241-6247.
66. Roberts JA, Kirkpatrick CM, Roberts MS, Robertson TA, Dalley AJ, Lipman J. Meropenem dosing in critically ill patients with sepsis and without renal dysfunction: intermittent bolus versus continuous administration? Monte Carlo dosing simulations and subcutaneous tissue distribution. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(1):142-150.
67. Wilson APR. Sparing carbapenem usage. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(9):2410-2417.

68. Nakane T, Tamura K, Hino M, Tamaki T, Yoshida I, Fukushima T et al. Cefozopran, meropenem, or imipenem-cilastatin compared with cefepime as empirical therapy in febrile neutropenic adult patients: A multicenter prospective randomized trial. *J Infect Chemother.* 2015;21(1):16-22.
69. Leu HS, Ye JJ, Lee MH, Su LH, Huang PY, Wu TL et al. Synergy of imipenem/colistin methanesulfonate combinations against imipenem-nonsusceptible multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Microbiol Immunol Infect.* 2014;47(5):406-411.
70. Heo YA. Imipenem/Cilastatin/Relebactam: A Review in Gram-Negative Bacterial Infections. *Drugs.* 2021;81(3):377-388.
71. Gales AC, Azevedo HD, Cereda RF, Girardello R, Xavier DE; INVITA-A-DORI Brazilian Study Group. Antimicrobial activity of doripenem against Gram-negative pathogens: results from INVITA-A-DORI Brazilian study. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(6):513-520.
72. Qu XY, Hu TT, Zhou W. A meta-analysis of efficacy and safety of doripenem for treating bacterial infections. *Braz J Infect Dis.* 2015;19(2):156-162.
73. Yatera K, Naito K, Noguchi S, Akata K, Yamasaki K, Nishida C et al. Clinical efficacy and safety of high-dose doripenem in Japanese patients with pneumonia. *J Infect Chemother.* 2016;22(3):137-142.
74. Christiansen KJ, Ip M, Ker HB, Mendoza M, Hsu L, Kiratisin P et al. In vitro activity of doripenem and other carbapenems against contemporary Gram-negative pathogens isolated from hospitalised patients in the Asia-Pacific region: results of the COMPACT Asia-Pacific Study. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(6):501-506.

75. Urban C, Mariano N, Rahal JJ. In vitro double and triple bactericidal activities of doripenem, polymyxin B, and rifampin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(6):2732-2734.
76. Paterson DL, Depestele DD. Doripenem. *Clin Infect Dis*. 2009;49(2):291-298.
77. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017;16(1):18.
78. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997;41(2):223-232.
79. Sawai T, Mitsuhashi S, Yamagishi S. Drug resistance of enteric bacteria. XIV. Comparison of beta-lactamases in gram-negative rod bacteria resistant to alpha-aminobenzylpenicillin. *Jpn J Microbiol*. 1968;12(4):423-434.
80. Richmond MH, Sykes RB. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol*. 1973;9:31-88.
81. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1980;289(1036):321-331.
82. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976.
83. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-458.

84. Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB 3rd, Moland ES, Lockhart TJ et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(11):4438-4440.
85. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003;51(3):711-714.
86. Yang C, Guo M, Yang H, Wen Y, Zhu Z, Wang T et al. blaKPC-24-Harboring *Aeromonas veronii* from the Hospital Sewage Samples in China. *Microbiol Spectr.* 2022;10(3):e0055522.
87. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005;165(12):1430-1435.
88. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(3):622-632.
89. Palzkill T. Metallo- β -lactamase structure and function. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277:91-104.
90. Bush K, Bradford PA. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):e00047-19. Published 2020 Feb 26.
91. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo- β -Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2020;64(10):e00397-20.

92. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, McLaughlin RE, Biedenbach DJ, Bouchillon SK et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;60(2):1067-1078.
93. Wang N, Luo J, Deng F, Huang Y, Zhou H. Antibiotic Combination Therapy: A Strategy to Overcome Bacterial Resistance to Aminoglycoside Antibiotics. *Front Pharmacol*. 2022;13:839808.
94. Pitout JDD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*. 2019;33(1):e00102-19.
95. Dortet L, Naas T. Noncarbapenemase OXA-48 Variants (OXA-163 and OXA-405) Falsely Detected as Carbapenemases by the β Carba Test. *J Clin Microbiol*. 2017;55(2):654-655.
96. Fursova NK, Astashkin EI, Knyazeva AI, Kartsev NN, Leonova ES, Ershova ON et al. The spread of bla OXA-48 and bla OXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2015;14:46.
97. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(1):15-22.
98. Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011;55(3):1274-1278.

99. Mahalingam N, Manivannan B, Khamari B, Siddaramappa S, Adak S, Bulagonda EP. Detection of Antibiotic Resistance Determinants and Their Transmissibility among Clinically Isolated Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* from South India. *Med Princ Pract*. 2018;27(5):428-435.
100. Potron A, Rondinaud E, Poirel L, Belmonte O, Boyer S, Camiade S et al. Genetic and biochemical characterisation of OXA-232, a carbapenem-hydrolysing class D β -lactamase from *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(4):325-329.
101. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(1):633-636.
102. Karampatakis T, Antachopoulos C, Iosifidis E, Tsakris A, Roilides E. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece. *Future Microbiol*. 2016;11:809-823.
103. Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, Chauhan NK, Rajamohan G. Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2014;9(5):e96288.
104. Saw HT, Webber MA, Mushtaq S, Woodford N, Piddock LJ. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(6):1510-1519.
105. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbago BM, Poirel L, Segre JA et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis*. 2018;66(8):1290-1297.

106. Giske CG, Martinez-Martinez L, Cantón Spain R, Stefani S, Skov R, Glupczynski Y, et al. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. 2017.
107. Amjad A, Mirza Ia, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. *Iran J Microbiol.* 2011;3(4):189-193.
108. Tamma PD, Simner PJ. Phenotypic Detection of Carbapenemase-Producing Organisms from Clinical Isolates. *J Clin Microbiol.* 2018;56(11):e01140-18.
109. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4281-4283.
110. Meier M, Hamprecht A. Rapid detection of carbapenemases directly from positive blood cultures by the β -CARBA test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2019;38(2):259-264.
111. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One.* 2015;10(3):e0123690.
112. Tsai YM, Wang S, Chiu HC, Kao CY, Wen LL. Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):315.
113. Oviaño M, Barba MJ, Fernández B, Ortega A, Aracil B, Oteo J et al. Rapid Detection of OXA-48-Producing *Enterobacteriaceae* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2016;54(3):754-759.

114. Boutal H, Vogel A, Bernabeu S, Devilliers K, Creton E, Cotellon G et al. A multiplex lateral flow immunoassay for the rapid identification of NDM-, KPC-, IMP- and VIM-type and OXA-48-like carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother.* 2018;73(4):909-915.
115. Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y et al. Rapid Identification of OXA-48 and OXA-163 Subfamilies in Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacilli with a Novel Immunochromatographic Lateral Flow Assay. *J Clin Microbiol.* 2016;54(11):2832-2836.
116. Alizadeh N, Rezaee MA, Kafil HS, Barhaghi MHS, Memar MY, Milani M et al. Detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* by chromogenic screening media. *J Microbiol Methods.* 2018;153:40-44.
117. Bialvaei AZ, Kafil HS, Asgharzadeh M, Yousef Memar M, Yousefi M. Current methods for the identification of carbapenemases. *J Chemother.* 2016;28(1):1-19.
118. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432-438.
119. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol.* 2019;10:1823.
120. Osei Sekyere J, Govinden U, Essack SY. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2015;119(5):1219-1233.

121. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 13.0, 2023. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
122. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. J Clin Microbiol. 2012;50(12):3877-3880.
123. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. J Antimicrob Chemother. 2007;59(2):321-322.
124. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. Nat Microbiol. 2019;4(11):1919-1929.
125. Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Aguilar GR, Gray A et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. The Lancet. 2022;399(10325):629-655.
126. European Centre for Disease Prevention and Control & World Health Organization. Regional Office for Europe. (2022). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2022 – 2020 data. World Health Organization. Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/351141>. Accessed 24 Nov 2022.
127. Hekimoğlu CH, Batır E, Gözel EY, Altun D. Ulusal Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu 2021. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPOR_2021.pdf Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2022. Accessed 24 Nov 2022.

128. Hekimoğlu CH, Batır E, Gözel EY, Altun D. Ulusal Sağlık Hizmeti ile İlişkili Enfeksiyonlar Sürveyans Ağı Özet Raporu 2020. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Bulasici-hastaliklar-db/hastaliklar/SHIE/Raporlar/USHIESA_OZET_RAPORU_2020.pdf Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü. 2021. Accessed 24 Nov 2022.
129. Logan LK, Weinstein RA. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. *J Infect Dis.* 2017;215(suppl_1):S28-S36.
130. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):153-163.
131. Kazmierczak KM, Karlowsky JA, de Jonge BLM, Stone GG, Sahm DF. Epidemiology of Carbapenem Resistance Determinants Identified in Meropenem-Nonsusceptible *Enterobacterales* Collected as Part of a Global Surveillance Program, 2012 to 2017. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(7):e0200020.
132. Emeraud C, Godmer A, Girlich D, Vanparis O, Mahamdi F, Creton E et al. Activity of mecillinam against carbapenem-resistant *Enterobacterales*. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(10):2835-2839.
133. Onorato L, Sarnelli B, D'Agostino F, Signoriello G, Trama U, D'Argenzio A et al. Epidemiological, Clinical and Microbiological Characteristics of Patients with Bloodstream Infections Due to Carbapenem-Resistant *K. Pneumoniae* in Southern Italy: A Multicentre Study. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(5):633.
134. García-Castillo M, García-Fernández S, Gómez-Gil R, Pitart C, Oviaño M, Gracia-Ahufinger I et al. Activity of ceftazidime-avibactam against carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae from urine specimens obtained during the infection-carbapenem resistance evaluation surveillance trial (iCREST) in Spain. *Int J Antimicrob Agents*. 2018;51(3):511-515.

135. Castanheira M, Deshpande LM, Mendes RE, Doyle TB, Sader HS. Prevalence of carbapenemase genes among carbapenem-nonsusceptible *Enterobacterales* collected in US hospitals in a five-year period and activity of ceftazidime/avibactam and comparator agents. *JAC Antimicrob Resist*. 2022;4(5):dlac098.
136. Pourgholi L, Farhadinia H, Hosseindokht M, Ziaee S, Nosrati R, Nosrati M et al. Analysis of carbapenemases genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from Tehran heart center. *Iran J Microbiol*. 2022;14(1):38-46.
137. Ramadan RA, Bedawy AM, Negm EM, Hassan TH, Ibrahim DA, ElSheikh SM et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Among Patients with Ventilator-Associated Pneumonia: Evaluation of Antibiotic Combinations and Susceptibility to New Antibiotics. *Infect Drug Resist*. 2022;15:3537-3548.
138. El-Kady RAE, Elbaiomy MA, Elnagar RM. Molecular Mechanisms Mediating Ceftazidime/Avibactam Resistance Amongst Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Cancer Patients. *Infect Drug Resist*. 2022;15:5929-5940.
139. Fu P, Luo X, Shen J, He L, Rong H, Li C et al. The molecular and epidemiological characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from children in Shanghai, China, 2016-2021 [published online ahead of print, 2022 Aug 7]. *J Microbiol Immunol Infect*. 2022;S1684-1182(22)00111-6.
140. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D et al. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolated From Adult and Children Patients in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:314.

141. Çakar A, Akyön Y, Gür D, Karatuna O, Ögünç D, Baysa BÖ et al. Türkiye'de 2014 yılı içinde izole edilen karbapeneme dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması [Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey]. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):21-33.
142. Çalık Ş, Kansak N, Aksaray S. Phenotypic detection of carbapenemase production in carbapenem-resistant isolates with the rapid carbapenemase detection method (rCDM). J Microbiol Methods. 2022;200:106536.
143. Sağıroğlu P, Hasdemir U, Altınkanat Gelmez G, Aksu B, Karatuna O, Söyletir G. Performance of "RESIST-3 O.K.N. K-SeT" immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. Braz J Microbiol. 2018;49(4):885-890.
144. Durmuş MA. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenem direncinin fenotipik ve genotipik yöntemler ile araştırılması. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, 2017.
145. Erdem F. Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında direnç genlerinin belirlenmesi ve direnç plazmitlerinin PCR temelli replikon tiplendirmesi. Uzmanlık Tezi, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, İstanbul, 2016.
146. Hoşbul T, Aydoğan CN, Kaya S, Bedir O, Gümral R, Albay A. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarına Karşı Seftazidim-avibaktam ve Kolistinin In Vitro Etkinliği [In Vitro Activity of Ceftazidime-avibactam and Colistin Against Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates]. Mikrobiyol Bul. 2022;56(2):218-229.
147. Zarakolu P, Eser ÖK, Otlu B, Gürpınar Ö, Özakın C, Akalın H et al. In-vitro activity of fosfomicin against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates and

frequency of OXA-48, NDM, KPC, VIM, IMP types of carbapenemases in the carbapenem-resistant groups. J Chemother. 2022;34(4):235-240.

148. Bıçakçıgil A. Kan kültüründen izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında karbapenemaz varlığının fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 2018.
149. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2016;15:20.
150. Kutlu HH, Us E, Tekeli A. Bir üniversite hastanesinde 2010-2014 yılları arasında izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinin karbapenemaz genlerinin araştırılması ve moleküler epidemiolojisinin belirlenmesi [Investigation of carbapenemase genes and molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* strains isolated between 2010-2014 in a university hospitals]. Mikrobiyol Bul. 2018;52(1):1-12.
151. Yaşar M. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenemaz varlığının MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry) ile araştırılması ve real-time PCR yöntemi ile karşılaştırılması. Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir, 2019.
152. Bilik ÖA. Farklı klinik numunelerden izole edilen *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenem, kinolon, kolistin direncinin araştırılması ve karbapenem dirençli suşlarda multipleks PCR yöntemi ile KPC, NDM, VIM, OXA-48, IMP-1 genlerinin tespiti. Uzmanlık Tezi, Harran Üniversitesi Tıp Fakültesi, Şanlıurfa, 2017.
153. Genç S, Kolaylı F, Özçelik EY. Molecular characterization of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains by multiplex PCR and PFGE methods: The first K.

pneumoniae isolates co-producing OXA-48/KPC and KPC/NDM in Turkey. J Infect Chemother. 2022;28(2):192-198.

154. Özdemir H. Bir üniversite hastanesinde karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında karbapenem direnç genlerinin moleküler analizi ve suşların klonal ilişkisi. Uzmanlık Tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya, 2017.
155. Su HR, Turhan Ö, Erman Daloğlu CA, Ögünç MD, Özhak B, Öngüt G et al. Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacterales* Strains Isolated from Blood Cultures in Antalya, Turkey. Lab Med. 2020;51(6):601-605.
156. Hoang CQ, Nguyen HD, Vu HQ, Nguyen AT, Pham BT, Tran TL et al. Emergence of New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM) and *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) Production by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Southern Vietnam and Appropriate Methods of Detection: A Cross-Sectional Study. Biomed Res Int. 2019;2019:9757625.
157. Li J, Li C, Cai X, Shi J, Feng L, Tang K et al. Performance of modified carbapenem inactivation method and inhibitor-based combined disk test in the detection and distinguishing of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. Ann Transl Med. 2019;7(20):566.
158. Shaker OA, Gomaa HE, ElMasry SA, Halim RMA, Abdelrahman AH, Kamal JS. Evaluation of Combined Use of Temocillin Disk and Mastdisks Inhibitor Combination Set Against Polymerase Chain Reaction for Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. Open Access Maced J Med Sci. 2018;6(2):242-247.
159. Bartolini A, Frasson I, Cavallaro A, Richter SN, Palù G. Comparison of phenotypic methods for the detection of carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae*. Gut Pathog. 2014;6:13.

160. Sattler J, Brunke A, Hamprecht A. Systematic Comparison of Three Commercially Available Combination Disc Tests and the Zinc-Supplemented Carbapenem Inactivation Method (zCIM) for Carbapenemase Detection in *Enterobacterales* Isolates. *J Clin Microbiol.* 2021;59(9):e0314020.
161. Hojabri Z, Arab M, Darabi N, Kia NS, Lopes BS, Pajand O. Evaluation of the commercial combined disk test and minimum inhibitory concentration (MIC) determination for detection of carbapenemase producers among Gram-negative bacilli isolated in a region with high prevalence of blaOXA-48 and blaNDM. *Int Microbiol.* 2019;22(1):81-89.
162. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552-556.
163. Ohsaki Y, Kubo R, Hobson J, Davies M, Osaka S, Hayashi W et al. MASTDISCS combi Carba plus, a simple method for discriminating carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, including OXA-48-type producers. *Microbiol Immunol.* 2018;62(1):60-65.
164. Sakanashi D, Kawachi M, Uozumi Y, Nishio M, Hara Y, Suematsu H et al. Evaluation of commercial phenotypic assays for the detection of IMP- or New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Japan. *J Infect Chemother.* 2017;23(7):474-480.
165. Dortet L, Bernabeu S, Gonzalez C, Naas T. Evaluation of the Carbapenem Detection Set™ for the detection and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;91(3):220-225.

166. Pantel A, Souzy D, Sotto A, Lavigne JP. Evaluation of Two Phenotypic Screening Tests for Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(10):3359-3362.
167. van Dijk K, Voets GM, Scharringa J, Voskuil S, Fluit AC, Rottier WC et al. A disc diffusion assay for detection of class A, B and OXA-48 carbapenemases in *Enterobacteriaceae* using phenyl boronic acid, dipicolinic acid and temocillin. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(4):345-349.



8. EKLER

8.1. Ek1-Etik Kurul Onayı

Çalışma, Hitit Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 2022-17 karar numarası ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

