



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**



**ÇOCUK VE YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN
İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

Ayşe Hande TÜRK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Devran GERÇEKER**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**ÇOCUK VE YENİDOĞAN YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN
İZOLE EDİLEN KARBAPENEM DİRENÇLİ *KLEBSIELLA*
SUŞLARININ MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ**

Ayşe Hande TÜRK

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Devran GERÇEKER**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
TTU-2022-2374 proje numarası ile desteklenmiştir.

**ANKARA
2022**

Ankara Üniversitesi
Tıp Fakóltesi Dekanlığı'na,

Tıpta Uzmanlık Tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Çocuk ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Karbapenem Dirençli Klebsiella Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan araştırma tarafımda yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Bu tez çalışmasıyla ilgili tüm süreçler Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi İnsan Araştırmaları Etik Kurulu tarafından, 12 Kasım 2020 tarihinde, İ10-610-20 numaralı kararla onaylanmıştır.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşe Hande Türk

Tarih: 11.12.2022

İmza: 

ÖZGÜNLÜK RAPORU

Turnitin Orijinallik Raporu

Çocuk ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Karbapenem Dirençli
Klebsiella Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi Ayşe Hande Türk tarafından
tez (Tıpta Uzmanlık Tezi) den



- 12-Ara-2022 21:58 +03' de işleme konu
- NUMARA: 1979362458
- Kelime Sayısı: 25263

Benzerlik Endeksi

%14

Kaynağa göre Benzerlik

Internet Sources:

%11

Yayınlar:

%5

Öğrenci Ödevleri:

%4

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Ayşe Hande TÜRK	Sınav tarihi: 21 / 12 / 2022
Anabilim/Bilim Dalı	: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Devran GERÇEKER	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER	
Tezin Başlığı: Çocuk ve Yeni Doğan Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Karbepenem Dirençli Klebsiella Suşlarının Moleküler Epidemiyolojisi.	
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi ☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1 ☐ 2 ☐ 3

III. KARAR	
Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak	
☒ Kabulüne ☐ Reddine ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine	
☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

IV. AÇIKLAMALAR	
Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız	

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri

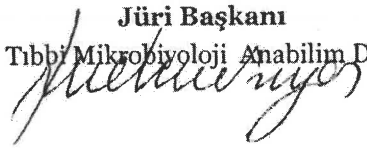
Prof.Dr. Mehmet KIVAN

Enf. Hast. ve KL Mikrobiyoloji Uzm.

Diy.Tes.No: 39530

Jüri Başkanı

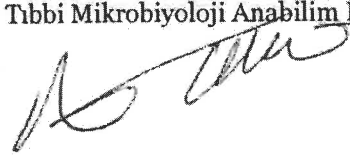
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Alper TEKİN

Jüri Üyesi

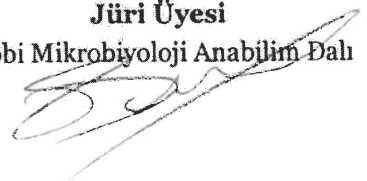
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



Prof. Dr. Devran Gerçeker

Jüri Üyesi

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı



ÖNSÖZ

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonları, yüksek morbidite ve mortalite oranları görülmesi nedeniyle önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Yenidoğan ve çocuk yoğun bakım hastaları bu enfeksiyonların gelişimi açısından risk altındadır. Bu izolatlar, hastanelerde ve hastanelerin arasında hızlı bir yayılım göstermekte, antimikrobiyal direnç genlerinin hareketli genetik elemanlar ile bakteriler arasında aktarılmasına neden olmakta bunun sonucunda da, antimikrobiyal direnç oranlarının yükselmesine, salgınlara, hastane yatışlarının uzamasına ve mortalitenin artmasına neden olmaktadır. Bu çalışmada, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Yoğun Bakım ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinde yatmakta olan hastalardan bir yıllık sürede çeşitli kültür örneklerinden üreyen, karbapenem dirençli *Klebsiella* izolatlarının moleküler epidemiyolojik özelliklerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tez çalışmamda bilgi ve tecrübesinin yanında manevi desteğiyle her zaman arkamda hissettiğim değerli büyüğüm, danışmanım ve Anabilim Dalı Başkanımız, Prof. Dr. Devran GERÇEKER'e,

Tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve bilgisini esirgemeyen, bilimsellik ve etik anlayışıyla meslek hayatımda örnek alacağım Prof. Dr. Alper TEKELİ'ye,

Uzmanlık eğitimim boyunca akademik bilgi ve tecrübelerini aktaran Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın tüm değerli Öğretim Üyelerine, birlikte çalışmaktan keyif aldığım Tıbbi Mikrobiyoloji uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın bütün personeline,

Yaşamım boyunca destek ve sevgilerini hep yanımda hissettiğim, beni yetiştiren sevgili aileme teşekkür ederim.

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TTU-2022-2374 proje numarası ile desteklenmiştir.

Dr. Ayşe Hande TÜRK

Ankara 2023

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Özgünlük Raporu.....	iii
Kabul Onay Sayfası.....	iv
Önsöz.....	v
İçindekiler.....	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	ix
Şekiller Dizini.....	xi
Tablolar Dizini.....	xii
1. TÜRKÇE ÖZET	1
2. ABSTRACT.....	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	5
4. GENEL BİLGİLER	7
4.1. <i>Klebsiella</i> Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri.....	7
4.2. <i>Klebsiella</i> Enfeksiyonları	9
4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'de Antimikrobiyal Direnç Sorunu	11
4.4. <i>K. pneumoniae</i> 'de Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları	13
4.4.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları	13
4.4.1.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar	13
4.4.1.2. AmpC Beta-Laktamazlar	14
4.4.1.3. Karbapenemazlar	15
4.4.2. Aminoglikozit Grubu Antimikrobiyallere Direnç	16
4.4.3. Kinolon Grubu Antimikrobiyallere Karşı Direnç	17
4.4.4. Kolistine Karşı Direnç	18
4.5. <i>K. pneumoniae</i> 'nin Kapsül Özellikleri	19
4.6. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri	20
4.6.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE).....	21
4.6.2. Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST)	22

5. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
5.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi, Tiplendirilmesi ve Saklanması	24
5.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	24
5.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi.....	25
5.2.2. Gradyent Şerit Test Yöntemi	25
5.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi	26
5.3. Karbapenemaz Üretiminin Taranması.....	26
5.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Suşlarından DNA Elde Edilmesi	27
5.5. Antimikrobiyal Ajanlara Dirençten Sorumlu Gen Bölgelerinin PZR ile Saptanması.....	27
5.5.1. GSBL Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması	27
5.5.2. AmpC Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması.....	29
5.5.3. Karbapenemaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması.....	31
5.5.4. Aminoglikozitlere Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması	33
5.5.5. Plazmit Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması .	35
5.5.6. Taşınabilir Kolistin Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması	37
5.5.7. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Saptanması	38
5.6. <i>mgrB</i> Kromozomal Gen Mutasyonunun Saptanması	39
5.7. Kapsüler polisakkarit tiplerinin belirlenmesi	40
5.8. Pulsed Field Jel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)	41
5.8.1. PFGE Yönteminde Kullanılacak İzolatların Hazırlanması.....	41
5.8.2. İzolatların Agaroz Gömülmesi.....	42
5.8.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması	42
5.8.4. Agaroz Kalıpların Yıkınması	42
5.8.5. DNA'nın Kesim Enzimiyle Kesilmesi	42
5.8.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması	43
5.8.7. Elektroforez Sistemi	43
5.8.8. Jelin Boyanması.....	43

5.8.9. Sonuçların Değerlendirilmesi	43
5.9. Multilokus Sekans Tiplendirme	44
6. BULGULAR.....	46
6.1. İzolatların Genel Özellikleri	46
6.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Sonuçları	50
6.2.1. Disk Difüzyon Yönteminin Sonuçları	50
6.2.2. Gradyent Şerit Test Yönteminin Sonuçları.....	50
6.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Sonuçları.....	51
6.3. Karbapenemaz Üretimi Tarama Sonuçları	53
6.4. Antimikrobiyal Direnç Genlerini Saptamaya Yönelik PZR Sonuçları	53
6.4.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz PZR Sonuçları.....	53
6.4.2. AmpC Beta-Laktamaz PZR Sonuçları.....	56
6.4.3. Karbapenemaz PZR Sonuçları.....	56
6.4.4. Aminoglikozit Direnç Genlerinin Saptanmasına Yönelik PZR Sonuçları ..	58
6.4.5. Plazmit Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin Saptanmasına Yönelik PZR Sonuçları	60
6.4.6. Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Genlerinin PZR Yöntemiyle Saptanması..	62
6.5. <i>mgrB</i> Kromozomal Gen Mutasyonlarının Sonuçları.....	62
6.6. Kapsül Tiplendirme Sonuçları.....	64
6.7. PFGE Sonuçları	65
6.8. MLST Sonuçları	67
7. TARTIŞMA	71
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	83
9. KAYNAKLAR	85

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	: Mikrogram
µm	: Mikrometre
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AK	: Amikasin
AMC	: Amoksisilin klavulanat
bç	: Baz çifti
CAZ	: Seftazidim
CG	: Klonal grup
CIM	: Karbapenem inaktivasyon yöntemi
CIP	: Siprofloksasin
CTX	: Sefotaksim
CTX-M	: Sefotaksim-Münih
ÇİD	: Çoklu ilaç direnci
ECOFF	: Epidemiyolojik sınır değeri
EMB	: Eozin metilen mavisi
ETP	: Ertapenem
FEP	: Sefepim
FOX	: Sefoksitin
FTS	: Fizyolojik tuzlu su
GN	: Gentamisin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
hvkp	: Hipervirülan <i>Klebsiella pneumoniae</i>
I	: Artmış dozda duyarlı
IMP	: İmipenem
KKA	: Koyun kanlı agar
KOL	: Kolistin
Kpaz	: Karbapenemaz
KPC	: <i>K. pneumoniae</i> karbapenemaz
LEV	: Levofloksasin

MALDI-TOF MS	: Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi
MEM	: Meropenem
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
mL	: Mililitre
MLST	: Multilokus sekans tiplendirme
NDM	: New Delhi metallo-beta-laktamaz
OXA	: Oksasilinaz
PAKD	: Plazmit aracılı kinolon direnci
PFGE	: Pulsed field jel elektroforezi
PİD	: Pan-ilaç direnci
PTZ	: Piperasilin tazobaktam
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
R	: Dirençli
RMT	: 16S rRNA metiltransferaz
S	: Duyarlı
ST	: Sekans tipi
TOB	: Tobramisin
VIM	: Verona integron-encoded metallo-beta-laktamaz
YİD	: Yaygın ilaç direnci

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 6.1.	Gradiyent şerit test yöntemi	51
Şekil 6.2.	<i>bla_{SHV}</i> elektroforez görüntüsü	53
Şekil 6.3.	<i>bla_{CTX-M}</i> elektroforez görüntüsü	54
Şekil 6.4.	<i>bla_{TEM}</i> elektroforez görüntüsü	54
Şekil 6.5.	AmpC beta-laktamaz elektroforez görüntüsü	56
Şekil 6.6.	Karbapenemaz elektroforez görüntüsü.....	57
Şekil 6.7.	16S rRNA metiltransferaz jel elektroforezi	58
Şekil 6.8.	Plazmit aracılı kinolon direnç genleri jel elektroforezi	60
Şekil 6.9.	Farklı PFGE grupları ile elde edilen dendogram	66

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 4.1.	<i>Klebsiella</i> türlerini ayırt eden biyokimyasal özellikler	8
Tablo 4.2.	Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri	20
Tablo 5.1.	Disk difüzyon yönteminde Enterobacterales takımı için kullanılan antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapları sınır değerleri	25
Tablo 5.2.	Enterobacterales takımı için kullanılan minimum inhibitör konsantrasyon sınır değerleri.....	26
Tablo 5.3.	GSBL için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri	27
Tablo 5.4.	AmpC beta laktamaz genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri.....	30
Tablo 5.5.	Karbapenemaz için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri	31
Tablo 5.6.	16S rRNA metiltransferaz genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri	34
Tablo 5.7.	Plazmid aracılı kinolon direnç genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri	36
Tablo 5.8.	<i>mcr1-5</i> için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri	37
Tablo 5.9.	<i>mgrB</i> gen bölgesini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler	39
Tablo 5.10.	<i>wzi</i> gen bölgesini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler	40
Tablo 5.11.	‘Housekeeping’ gen bölgelerini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler.....	44
Tablo 6.1.	<i>K. pneumoniae</i> izolatlarının elde edildiği örneklerin dağılımı.....	46
Tablo 6.2.	<i>K. pneumoniae</i> suşlarının epidemiyolojik özellikleri.....	47
Tablo 6.3.	Disk difüzyon yöntemi sonuçları	50
Tablo 6.4.	Gradyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK sonuçları	52
Tablo 6.5.	<i>K. pneumoniae</i> izolatlarının GSBL dağılımı.....	55
Tablo 6.6.	<i>K.pneumoniae</i> izolatlarının karbapenemaz dağılımı.....	57
Tablo 6.7.	<i>K. pneumoniae</i> izolatlarının 16S rRNA metiltransferaz genlerinin dağılımı.....	59

Tablo 6.8. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin dağılımı.....	61
Tablo 6.9. <i>mgrB</i> allellerine ait nükleotit dizileri	63
Tablo 6.10. <i>mgrB</i> proteinlerine ait aminoasit dizileri.....	64
Tablo 6.11. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında saptanan <i>mgrB</i> mutasyonları.....	64
Tablo 6.12. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının <i>wzi</i> allelleri ve kapsüler tipleri.....	65
Tablo 6.13. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının sekans tipleri ve moleküler özellikleri.....	69

1. TÜRKÇE ÖZET

AMAÇ: Bu çalışmada; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Yoğun Bakım ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinde yatmakta olan hastalardan Kasım 2020-2021 arasında çeşitli kültür örneklerinden üreyen ve karbapenem dirençli *Klebsiella* izolatlarının moleküler epidemiyolojik özellikleri incelenmiştir. İzolatların taşıdığı beta-laktam, aminoglikozit, kinolon grubu antimikrobiyallere ve kolistine direnç oluşumuna neden olan aktarılabılır antimikrobiyal direnç genlerinin ve kolistin direncine neden olan kromozomal mekanizmaların açığa çıkarılarak, bu izolatların epidemiyolojik ilişkilerinin ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM: Tanımlaması MALDI-TOF MS ile yapılan izolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesinde disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Karbapenem, aminoglikozit ve kinolon minimum inhibitör konsantrasyonlarının (MİK) saptanmasında gradiyent şerit test ve kolistin duyarlılığının belirlenmesi için sıvı mikrodilüsyon yöntemi uygulanmıştır. Karbapenemaz üretiminin fenotipik olarak belirlenmesi için karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM) kullanılmıştır. Beta-laktamlara dirence neden olan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), AmpC beta-laktamaz ve karbapenemaz, aminoglikozit direncine neden olan 16S rRNA metiltransferazlar, kinolon direncine neden olan plazmit aracılı kinolon direnci (PAKD) genleri, ve kolistin direncine yol açan mobil kolistin direnci genleri polimeraz zincir reaksiyonları (PZR) ile araştırılmıştır. Kapsüler polisakkarit tiplerini belirlemek için *wzi* geni dizilemesi yapılmıştır. İzolatların arasındaki benzerlik ve farklılıkları ortaya koymak için pulsed field jel elektroforezi (PFGE) uygulanmıştır. İzolatların klonal yayılımını belirlemek amacıyla multilokus sekans tiplendirme (MLST) yapılmıştır.

BULGULAR: *K. pneumoniae* olarak tanımlanan 36 örneğin tamamı amoksisilin klavulonat, piperasilin tazobaktam, sefotaksim, seftazidim ve sefepim dirençliyen, 24'ü (%66,66) sefoksitine, 31'i (%86,11) ertapeneme, 21'i (%58,33) imipeneme, 16'sı (%44,44) meropeneme, 10'u (%27,77) amikasine, 28'i (%77,77) gentamisine, 31'i (%86,11) tobramisine, 29'u (%80,55) siprofloksasine, 19'u (%52,77) levofloksasine, 11'i (%30,56) kolistine dirençli olduğu saptanmıştır. CIM testi OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatlarda pozitif tespit edilirken NDM tipi karbapenemaz üreten bir izolatın karbapenemaz üretimi negatif bulunmuştur. Tüm izolatlarda *bla_{SHV}* geni bulunurken; buna ek olarak 12 (%33,33) izolatta *bla_{CTX-M}* pozitif saptanmıştır. On dokuz (%52,7) izolatta *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{TEM}* birlikte pozitif saptanmıştır. CIT grubu AmpC beta-laktamaz iki (%5,56) örnekte bulunmuştur.

Karbapenemaz genlerinden *bla*_{OXA-48} 33 (%91,67), *bla*_{NDM} 1 (%2,78) ve *bla*_{KPC} 1 (%2,78) izolatta pozitif bulunurken, bir izolatta karbapenemaz geni bulunmamıştır. 16S rRNA metiltransferaz genleri *armA* ve *rmtC* sırasıyla, 3 (%8,33) ve 2 (%5,56) izolatta saptanmıştır. PAKD genlerinden *qnrB* 19 (%52,78), *qnrS* 6 (%16,67), *qnrB* ve *qnrS* iki (%5,56) izolatta pozitif bulunmuştur. Aktarılabılır kolistin direncine neden olan *mcr* genleri saptanmazken, kolistine dirençli tüm izolatlarda kromozomal *mgrB* geni mutasyonları bulunmuştur. İzolatlarda dokuz farklı kapsül tipi belirlenirken en sık K2 bulunmuştur. PFGE ile 15 farklı patern saptanmış, 17 izolatın (%47,22) tek bir paternde toplandığı görülmüştür. MLST ile 18 (%50,00) izolat ST 14 olarak belirlenmiştir. 3 izolat (%8,33) ST 2096, 3 (%8,33) izolat ST 661, ikişer izolat ST 147 ve ST 985, birer izolat ise; ST 37, ST 152, ST 101, ST 17, ST 307 ve ST 39 olarak bulunmuştur.

SONUÇ: Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları, çok sayıda aktarılabılır antimikrobiyal direnç genini bir arada taşımakta ve yüksek riskli klonlarının yayılımı nedeniyle yenidoğan ve çocuk yoğun bakım hastalarında önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. *K. pneumoniae* izolatlarının antimikrobiyal direnç özelliklerinin ve klonlarının yayılımlarının belirlenmesi; tedavi seçimine yol gösterebilecek, enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkin bir şekilde uygulanmasına ve yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ışık tutabilecektir.

ANAHTAR KELİMELEER: *Klebsiella pneumoniae*, karbapenemaz, çoklu ilaç direnci, moleküler epidemiyoloji, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar, çocuk yoğun bakım ünitesi, yenidoğan yoğun bakım ünitesi.

2. ABSTRACT

AIM: In this study, molecular epidemiological characteristics of carbapenem resistant *Klebsiella* isolates grown in various cultures of patients hospitalized in Ankara University School of Medicine Neonatal and Pediatric Intensive Care Units were investigated. It is aimed to demonstrate the transferable antimicrobial resistance genes harbored by isolates which cause resistance to beta-lactam, aminoglycoside, quinolone group antimicrobials and colistin also to determine the chromosomal mechanisms that cause colistin resistance. In addition, it is aimed to search epidemiological relationships among the isolates.

MATERIALS AND METHODS: Antimicrobial susceptibility tests of the *K. pneumoniae* isolates, identified by MALDI-TOF MS were performed using disk diffusion method. Minimum inhibitory concentrations (MIC) for carbapenems, aminoglycosides and quinolones were determined using gradient strip test and broth microdilution method was used for colistin susceptibility. Carbapenemase production was screened phenotypically by carbapenemase inactivation (CIM) method. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL), AmpC beta-lactamase and carbapenemase enzymes causing resistance to beta-lactams, 16S rRNA methyltransferases causing resistance to aminoglycosides, plasmid mediated quinolone resistance (PMQR) genes causing quinolone resistance, and mobile colistin resistance genes causing colistin resistance were investigated by polymerase chain reactions (PCR). In order to determine the types of capsular polysaccharides, *wzi* gene sequencing was performed. Pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed to find out similarities and differences among the isolates. Multilocus sequence typing (MLST) was used to determine the clonal spread of the isolates and their antimicrobial resistant genes.

RESULTS: All 36 isolates identified as *K. pneumoniae* were resistant to amoxicillin clavulanate, piperacillin tazobactam, cefotaxime, ceftazidime and cefepime. Resistance rates to cefoxitine, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin, gentamicin, tobramycin, ciprofloxacin, levofloxacin and colistin were 66.67% (n=24), 86.11% (n=31), 58.33% (n=21), 44.44% (n=16), 27.78% (n=10), 77.78% (n=28), 86.11% (n=31), 80.56% (n=29), 52.78% (n=19) and 30.56% (n=11), respectively. OXA-48 like carbapenemase producing isolates were found to be positive with CIM test while single isolate producing NDM type carbapenemase was negative. *bla_{SHV}* gene was detected in all isolates, in addition, 12 (33.33%) isolates were harboring *bla_{CTX-M}*. Nineteen (52.7%) isolates were *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}* and *bla_{TEM}* positive. CIT

group AmpC beta-lactamase was found in two (5.56%) isolates. The carbapenemase genes *bla*_{OXA-48} was found in 33 (91.67%) isolates, *bla*_{NDM} in one (2.78%) and *bla*_{KPC} in one (2.78%) isolate. No carbapenemase gene was detected in one of the isolates. The 16S rRNA methyltransferase genes *armA* was found in three (8.33%) and *rmtC* in two (5.56%) isolates. The PMQR genes *qnrB* was found in 19 (52.78%), *qnrS* in six (16.67%), and *qnrB* and *qnrS* in two (5.56%) isolates. No *mcr* genes causing transferable colistin resistance were detected in any of the isolates while chromosomal *mgrB* gene mutations were found in all colistin resistant isolates. Nine different capsule types with K2 being the most prevalent one were determined in the isolates. PFGE revealed 15 different pattern for the isolates. Seventeen (47.22%) isolates had one single pattern. MLST showed 18 (50.00%) isolates were ST14, three (8.33%) isolates were ST2096. Two isolates were observed as ST661, ST147 and ST985 and only one isolate was identified as ST37, ST152, ST101, ST17, ST307 and ST39.

CONCLUSIONS: Carbapenem resistant *K. pneumoniae* strains cause important health problem in neonatal and pediatric intensive care units due to their ability to harbor multiple transferable resistance genes and spread of high risk clones. Determining the antimicrobial resistance properties and the clonal spread of the isolates will guide the treatment choice, effective implementation of infection control measures and the development of new antimicrobial strategies.

KEY WORDS: *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemase, multidrug resistance, molecular epidemiology, healthcare associated infections, pediatric intensive care unit, neonatal intensive care unit.

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella türleri, birçok canlı türünde kommensal ve/veya patojen olarak bulunmakta aynı zamanda çevresel örneklerden de izole edilmektedir. Bu türlerin arasında, klinik örneklerde en sık *Klebsiella pneumoniae* hastalık etkeni olarak tanımlanmaktadır (1, 2). *K. pneumoniae* sıklıkla sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyonlar ile karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle, yenidoğan ve çocuk yoğun bakım hastaları bu enfeksiyonlar açısından risk altındadır (3). İzolatlar arasında artmakta olan çoklu ilaç direnci bu patojenin yayılımından endişe duyulmasına sebep olmaktadır. Özellikle hareketli genetik elemanlar üzerinde bulunan direnç genlerinin, bakteriler arasında hızlı bir şekilde aktarılabilmesi, yayılımlarının dikkatli bir şekilde takip edilmesini gerektirmektedir. *K.pneumoniae* suşlarının prevalansı ve coğrafi dağılımı farklılık gösterir. Bazı sekans tiplerinin, ulusal ve uluslararası salgınlarda saptanmaları, aynı zamanda çok sayıda antimikrobiyal direnç genini birlikte taşıyabilmeleri nedeniyle önemlidir (4).

K.pneumoniae, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla tercih edilen beta-laktam grubu antibiyotiklere, özellikle beta-laktamaz üretimi ile direnç gösterir. Bu enzimleri kodlayan genler plazmitler aracılığıyla aktarılabilen ve bu nedenle hızla yayılabilmektedir (5). Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ve AmpC beta-laktamaz enzimlerinin üretimi ile sefalosporinlerin etkisiz kalmasıyla tedavide karbapenem grubu antimikrobiyaller yerini almıştır. Günümüzde, özellikle karbapenemaz üretimi nedeniyle karbapenemler de bu enfeksiyonların tedavisinde yetersiz kalmaktadır (6). Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının önemli bir özelliği de, diğer antimikrobiyal gruplarına da dirence neden olan aktarılabilir direnç genlerini bir arada bulundurabilmesidir (3). Aminoglikozitlere karşı direnç oluşumuna neden olan 16S rRNA metiltransferaz enzimleri ve kinolonlara karşı dirence neden olan plazmit aracılı kinolon direnç genleri de karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında bulunabilen aktarılabilir antimikrobiyal direnç genlerindendir (7, 8).

Çoklu ilaç dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tedavi seçeneklerini nefrotoksik etkisi bakımından kısıtlaması nedeniyle kullanımı terk edilmiş olan kolistin yeniden kullanılmaya başlanmıştır. Ancak, özellikle lipopolisakkarit sentezini kontrol eden kromozomal genlerden *mgrB*'deki değişiklikler ile *K. pneumoniae* bu antimikrobiyal ajana da dirençli hale gelmektedir. Kolistin direncine neden olan ve aktarılabilen mobil kolistin direnç genlerinin (*mcr*) tanımlanması, direncin yayılımını hızlandıracığından endişe oluşturmaktadır (9).

Çoklu ilaç direncine sahip olan yüksek riskli *K. pneumoniae* klonları, dünyada hızla yayılmaktadır (4). Hastanelerde yer alan klonların taşıdığı genetik belirteçlerin özelliklerinin araştırılması ile; bu klonların yerel ve uluslararası yayılımları belirlenebilecek, seçilen tedavilere yön verilebilecek, yeni antimikrobiyal ve enfeksiyon kontrol stratejilerinin geliştirilmesine yol gösterilebilecektir (5).

Bu çalışmada amaç; Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Yoğun Bakım ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinde yatmakta olan hastalardan bir yıllık sürede çeşitli kültür örneklerinden elde edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının taşıdığı aktarılabılır antimikrobiyal direnç genlerini ve kolistin direnç mekanizmalarını bu izolatların epidemiyolojik ilişkilerini de göz önünde bulundurarak araştırmaktır. Bu amaç doğrultusunda;

1. İzolatların beta-laktam, aminoglikozit, florokinolon ve kolistin duyarlılık kategorileri fenotipik antimikrobiyal duyarlılık testleri ile belirlenmiştir.
2. İzolatlarda, plazmit ile aktarılabılır; GSBL, AmpC beta-laktamaz, karbapenemaz, 16S rRNA metiltransferaz, plazmit aracılı kolistin direnç genleri ve *mcr* genlerinin varlığı araştırılmıştır.
3. Kolistin direncine neden olan *mgrB* geni değişiklikleri belirlenmiştir.
4. İzolatların kapsüler polisakkarit tipleri belirlenmiştir.
5. Pulsed field jel elektroforezi ve multilokus sekans tiplendirme ile izolatların klonal ilişkisi araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Klebsiella* Cinsi Bakterilerin Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinin üyesi olan *Klebsiella* cinsi bakteriler; fakültatif anaerop, polisakkarit yapıda kapsül bulunduran, oksidaz testi negatif, sporsuz, hareketsiz, gram negatif basillerdir. Boyutları 0,3-1 µm genişliğinde ve 0,6-6 µm uzunluğundadır. Glukozu fermente ederek metil kırmızısı ve Voges-Proskauer testlerinde tanımlamaya yardımcı son ürünler oluştururlar, 18-47°C, pH 4,0-8,0 ve %0-5 tuz konsantrasyonu aralığında üreyebilirler (1).

Klebsiella cinsi, adını 19.yüzyılda yaşamış Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'ten almıştır. Bu basil; Carl Friedlander tarafından da ağır, genellikle ölümcül pnömoni etkeni olan Friedlander basili olarak tanımlanmıştır (2).

Klebsiella cinsinin sınıflandırılmasına ilişkin çeşitli yöntemlerle yapılmış ve halen devam eden çok sayıda çalışma vardır. Bu cins, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. singaporensis* ve *K. alba* olmak üzere altı tür içermektedir (2). Drancourt ve ark. 2001 yılında, *Klebsiella* türlerinin 16S r RNA ve *rpoB* (bakteriyel RNA polimeraz beta-alt ünite'yi kodlayan gen) dizilerinin analizini yaparak bu cinsin üç küme oluşturduğunu göstermiştir. Küme I'de *K. pneumoniae* subspecies *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subspecies *rhinoscleromatis*, *K. pneumoniae* subspecies *ozoenae* ve *K. granulomatis*; küme II'de *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. trevisanii* ve *K. terrigena*; küme III'te *K. oxytoca* yer almaktadır. Çalışmada; küme II, *Raoultella* cinsi olarak ayrılmıştır (10). Granier ve ark, *K. oxytoca*'yı *oxy-1* ve *oxy-2* genetik gruplarına karşılık gelen iki gruba ayırmıştır (11). Son olarak, bitkiler ve topraktan izole edilen üç yeni çevresel tür; *K. variicola*, *K. singaporensis* ve *K. alba* *Klebsiella* cinsine eklenmiştir (12-14).

Tüm genom dizileme yönteminin kullanıma girmesi, biyokimyasal ve proteomik analizler ile *K. pneumoniae* olarak tanımlanan izolatların önemli bir bölümünün aslında *K. pneumoniae* ile %95-96 oranında nükleotit benzerliği paylaşan yakın ilişkili türlere ait olduğunu açığa çıkarmıştır (15-17). Resmi bir taksonomik isimlendirmesi bulunmasa da diğer *Klebsiella* türleri ile ortalama %90 nükleotit benzerliği bulunan bakterileri Wyres ve ark. *K. pneumoniae* tür grubu (*K. pneumoniae* species complex) olarak isimlendirmişlerdir, bu gruptaki klinik izolatların yaklaşık %85'i *K. pneumoniae sensu stricto* olarak tanımlanırken grubun diğer üyeleri, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp.

quasipneumoniae, *K. quasivariicola*, *K. africana*, *K. variicola* subsp. *tropica*, *K. variicola* subsp. *variicola*'dır (3) .

Klebsiella cinsi bakteriler; hasta hizmeti veren klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında *Enterobacteriaceae* üyelerinin üretilmesinde kullanılan besiyerlerinde (örn. Adi agar, koyun kanlı agar, MacConkey agar, EMB agar) 37°C'de inkübe edildiğinde kolay ürer. İlk izolasyon plaklarında büyük mukoid koloniler varlığında *Klebsiella*'dan şüphelenilmelidir ancak tüm suşları mukoid değildir. MacConkey agarda, büyük, mukoid, laktoz fermentasyonu ve asit üretimini gösteren pembe renkli koloniler oluştururlar. *Klebsiella* türleri hareketsizdir ve ornitin dekarboksilasyonu yapmazlar. Çoğu suşları üreyi yavaş hidroliz eder. Triptofan aminoasitinden indol üretimi *K.pneumoniae*'de negatif, *K. oxytoca*'da pozitifdir. Farklı türlere ait biyokimyasal özellikler Tablo 3.1'de gösterilmiştir (2, 5).

Tablo 4.1. *Klebsiella* türlerini ayırt eden biyokimyasal özellikler

Biyokimyasal Test	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K.oxytoca</i>
İndol	-	-	-	+
Metil kırmızısı	-	+	+	+/-
Voges-Proskauer	+	-	-	+
Sitrat	+	+/-	-	+
Üreaz	+	-	-	+
Lizin	+	+/-	-	+
Ornitin	-	-	-	-
Orto-nitrofenil-β-D-galaktozidaz	+	+/-	+	+
Malonat	+	-	+	+

Bakterilerin tanımlanması için ticari tanımlama sistemleri laboratuvarlarda artan sıklıkta kullanılmaktadır. Geleneksel, modifiye besiyerleri ve kromojenik substratları kullanarak mikroorganizma tanımlamasını sağlayan sistemlere API 20E (bioMérieux, Fransa), BBL Crystal Enteric/NonFermenter ID Sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems, Amerika Birleşik Devletleri (ABD)), RapID onE Sistemi (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD), Biolog GN2 Microplate (Biolog,ABD), MicroScan Sistemi (Beckman Coulter, ABD), Sensititre Sistemi (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, ABD) örnek verilebilir. Floresan temelli yöntemleri kullanan MicroScan Walkaway (Beckman Coulter, ABD), Vitek Sistemi (bioMérieux, Fransa), Sensititre Gram-Negatif Otomatik Tanımlama Sistemi (Thermo Fisher Scientific Inc., ABD), Phoenix Sistemi (Becton Dickinson Microbiology Systems, ABD) ve

karbon kaynağı kullanım testi ile bakteri tanımlamasını gerçekleştiren OmniLog ID Sistemi (Biolog, ABD) yarı ve tam otomatize tanımlama sistemleridir (2).

Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) ile tür tanımlaması, immünolojik veya biyokimyasal yöntemlere göre daha hızlı, doğru ve ucuzdur (17). Bu yöntemde, araştırılan mikroorganizmaya ait koloni bir plaka üzerine yayılır ve üzeri kristalize moleküllerden oluşan matriks ile kaplanır. Kurutulan örneğin üzerine matriks kristalleri hedeflenerek lazer atışı yapılır. Lazer enerjisini emen matrikste parçalanma ve proton eklenmesiyle iyonizasyon gerçekleşir. Matriks, eklenen protonu incelenen mikroorganizmanın moleküllerine ileterek analitin yüklü hale gelmesini sağlar. Bu işlemde sonra ortaya çıkan iyonlar, nötral bir molekül ve eklenmiş veya çıkarılmış bir iyon şeklinde olacaktır. Yük ve kütle zeminine sahip iyonize matriksi ayıran bir kolon üzerinde yolculuk eden kütle spektrumları, yolun sonunda bir sinyal kalıbı oluşturan bir dedektöre ulaşır. Oluşturulan kütle spektrumları, bu sisteme özgü bir yazılım ile incelenir ve veri tabanı ile karşılaştırılır. Bu yöntem, *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında biyokimyasal yöntemlere göre belirgin bir üstünlük sağlamaktadır (2).

4.2. *Klebsiella* Enfeksiyonları

Klebsiella türleri birçok canlı türünde kommensal veya patojen mikroorganizmalar olarak bulunabildiği gibi toprak ve sudan da izole edilebilir (1). İnsanlarda kolonize olan ve hastalık etkeni olarak kabul edilen türlerin yol açtığı enfeksiyonlar aşağıda sıralanmıştır.

K. pneumoniae, klinik örneklerde en sık izole edilen *Klebsiella* türü olarak nitelendirilmektedir (2). Sindirim ve solunum sisteminde kolonizasyonu yaygın olmakla birlikte prevalansı; yaş grubu, coğrafi bölge ve yakın zamanlı sağlık hizmeti varlığı ile değişmektedir. ABD ve Avusturalya’da yapılmış çalışmalara göre bağırsak kolonizasyonu toplumda %4-6 arasında bulunmuş; ABD, Avusturalya ve İngiltere’de yakın zamanlı sağlık hizmeti almış bireylerde %25’e ulaşabildiği gösterilmiştir (18-21). Kore, Japonya, Singapur, Tayvan ve Malezya’da ise sağlıklı erişkinlerde kolonizasyon oranları %18-87 arasındadır (22, 23). *K. pneumoniae*’nın bağırsak kolonizasyonunun süresi tam belirlenememiş olsa da Löhr ve ark. 12 ayı geçebildiğini bildirmiştir (24).

Genellikle sağlık hizmeti ilişkili olarak karşımıza çıkan *K. pneumoniae* enfeksiyonları, sıklıkla pnömoni, üriner sistem, yara enfeksiyonları ve bakteriyemi şeklinde görülmektedir (3). Bu enfeksiyonlar klasik *K. pneumoniae* enfeksiyonları olarak da adlandırılmaktadır. Risk

altındaki hasta grupları; yenidoğanlar, yaşlılar, immün düşkün, protez ve medikal cihazları bulunan kişilerdir. Bu hastalarda, kommensal *K. pneumoniae*'nin immünolojik kontrolünün yetersizliği nedeniyle bakterinin aşırı üremesi sonucu enfeksiyon olduğu düşünülmektedir. Bağırsak kolonizasyonu enfeksiyon gelişiminde anahtar risk faktörüdür; yoğun bakım ve onkoloji hastalarında bağırsak kolonizasyonu varlığında enfeksiyon riskinin dört kat arttığı gösterilmiştir (18). *K. pneumoniae* aynı zamanda neonatal sepsisin en sık etkenlerinden biridir (3).

K. pneumoniae enfeksiyonları sağlık hizmeti almış kişilerde daha çok görülmekle birlikte, alkolizm, diabetes mellitus, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi altta yatan kronik hastalıkların varlığında akciğer enfeksiyonlarının görülme sıklığı artabilir. Pnömoni görülürse yaygın nekroz ve hemoraji ile yıkıcı olma eğilimindedir. Bu hastalarda; mukoid, tuğla kırmızısı balgam görülebilir. Akciğer apsesi, kronik kaviter hastalık, internal hemoraji, hemoptizi ise ağır hastalarda görülebilir, ayrıca plörit de sıklıkla eşlik etmektedir (25). *K. pneumoniae* aynı zamanda enterit, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları, sepsis gibi çeşitli ekstrapulmoner hastalıklara da neden olabilir (2).

Russo ve ark., son yıllarda *K. pneumoniae*'nin hipervirülan klinik varyantının (hvKP) ortaya çıktığını belirtmektedir (26). Uzak alanlara metastaz yapan piyojenik karaciğer apsesi şeklinde ortaya çıkan toplum kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonları, ilk olarak Asya-Pasifik ülkelerinde raporlanmakla birlikte, günümüzde dünyanın diğer bölgelerinde de görülmektedir (27, 28). Bu enfeksiyonlar klasik *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının aksine; hastane ortamının dışında, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon risk faktörlerini taşımayan sağlıklı bireylerde gelişen fırsatçı olmayan enfeksiyonlar olarak ortaya çıkmıştır, yaygın toplum kaynaklı hvKP enfeksiyonları; endoftalmit, pnömoni, nekrotizan fasiit, non-hepatik apse, menenjit ve biliyer sistem enfeksiyonu olmadan ortaya çıkan piyojenik hepatik apselerdir (28, 29). Bu enfeksiyonlara sıklıkla bakteriyemi ve metastatik yayılım da eşlik etmektedir (26).

K. pneumoniae'nin alt türleri olarak tanımlanan *K. ozoenae* ve *K. rhinoscleromatis* nadir görülen enfeksiyonlara neden olmaktadır. *K. ozoenae*, ozena adı verilen atrofik rinit ve nazal mukozanın pürülan enfeksiyonu ile ilişkilidir (2). Janda ve ark (1985) ise aynı türe bağlı korneal apse vakası da tanımlamışlardır (30). Bu alt türün aynı zamanda, kan, idrar, yumuşak doku örneklerinden de izole edilmesi hastalık spektrumunun daha geniş olduğunu düşündürmektedir (31). İkinci alt tür olan *K. rhinoscleromatis* ise respiratuvar mukoza, orofarenks, burun ve

paranasal sinüsleri etkileyen ve granüloamatöz bir hastalık olan rhinoskleromaya neden olmaktadır (2).

K. oxytoca, antibiyotik ilişkili hemorajik kolit etkeni olarak gösterilmiştir (32). Kanlı ishal ve şiddetli abdominal kramplara neden olan bu türe bağlı enfeksiyonlar penisilin, kinolon ve sefalosporin kullanımı ile ilişkilendirilmiştir (33). Bu hastalarda, kolonoskopide psödomembranlar olmadan yaygın hemoraji ve lamina proprianın inflamasyonu görülür. Tekrarlayan non-steroid antiinflamatuvar ilaç kullanımı hastalığın riskini arttırırken, antibiyotik kesilmesinden sonra hızla spontan iyileşme gerçekleşir (2).

4.3. *Klebsiella pneumoniae*'de Antimikrobiyal Direnç Sorunu

Mikroorganizmalarda görülen antimikrobiyal direnç üç farklı tip olarak tanımlanmıştır. Bunlar, çoklu ilaç direnci (ÇİD), yaygın ilaç direnci (YİD) ve pan-ilâç direnci (PİD) olarak isimlendirilmiştir. Bu tiplerin tanımları arasında farklı yayınlarda değişiklikler bulunmakla beraber, Magiorakos ve ark. tarafından ortak tanımlar oluşturulmuştur, buna göre, çoklu ilaç direnci, üç ya da daha fazla tedaviyle ilgili antimikrobiyal grubundan en az bir ajana direnç; yaygın ilaç direnci, bir ya da ikisi dışında tüm tedaviyle ilgili antimikrobiyal gruplarından en az bir ajana direnç; pan-ilâç direnci ise tedaviyle ilgili tüm antimikrobiyal ajanlara direnç olarak tanımlanmıştır (34).

Antimikrobiyal ajanlara karşı direnç, ilacın hedef proteinlerinin mutasyon ile değiştirilmesiyle, farklı türlerden ilaca daha az duyarlı hedef protein genlerinin edinilmesiyle, ilacın hücre içine veya hedefe ulaşmasının engellenmesiyle ya da ilacın enzimatik inaktivasyonu ile ortaya çıkabilir (35). Direnç mekanizmalarının çoğu, yatay yolla aktarılan edinilmiş antimikrobiyal direnç genleri ile ilişkilidir. Bu genlerin aktarılabilir olması bakteriler arasında hızlı bir şekilde yayılmasına neden olmaktadır (3).

Dünya Sağlık Örgütü, halk sağlığı için genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten ve karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'yi kritik öneme sahip bir tehdit olarak tanımaktadır (36). Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (The Infectious Diseases Society of America) tarafından da, çoklu ilaç dirençli ve sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon etkenleri olan ESKAPE patojenlerinden (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter spp.*) biri olarak belirlenmiştir (37). Çoklu ilaç dirençli *K. pneumoniae* suşları, Avrupa'da yılda, 90,000'den fazla enfeksiyona, 7,000'den fazla ölüme neden olmaktadır (38).

K. pneumoniae enfeksiyonu tanısı kesinleştğinde tedavi antimikrobiyal duyarlılık testi sonucuna göre belirlenmektedir. Uygun antimikrobiyal tedavi seçiminde, ilaç dirençli patojenlerle enfekte olma riskini ortaya koyan bölgesel bakteriyel duyarlılık paternleri ve hasta risk faktörleri de göz önünde bulundurulmaktadır. Ancak, çoklu ilaç dirençli suşların antimikrobiyallere yanıtınlığı nedeniyle tedavi karmaşık hale gelmekte, antibiyotik seçenekleri kısıtlanmakta ve sonuçta ampirik tedavi yetersiz kalmaktadır (5).

Enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sıklıkla beta laktam grubu antibiyotikler tercih edilmektedir. 1960-1970lerde *Enterobacteriaceae* ailesinde geniş spektrumlu beta-laktamazların tanımlanmasıyla ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler tedavide yerini almıştır (5) . Ancak, dünyada ve Türkiye’de devam etmekte olan sürveyans raporları incelendiğinde beta laktam grubu antibiyotiklere direnç oranının yüksekliği görülebilmektedir. 2020 EARS-Net raporuna göre üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli invaziv *K. pneumoniae* izolatlarının oranı çoğu Avrupa ülkesinde %25’in, özellikle Doğu ve Güney Avrupa’da %50’nin üzerindedir (39). Ülkemiz Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS) 2016 verilerine göre ise invaziv *K. pneumoniae* izolatlarında üçüncü kuşak sefalosporin direnci %68,5’dir (40). Sefalosporinlere dirençli *K. pneumoniae*’nin yayılması tedavide karbapenemlerin yaygın olarak kullanılmasına yol açmıştır. Ancak, 2020 EARS-Net raporuna göre Avrupa’da karbapenem dirençli invaziv *K. pneumoniae* izolatlarının oranı %10 iken; 2016 UAMDSS raporuna göre Türkiye’de direnç oranı %40,1’dir (39, 40).

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları beta-laktam antibiyotikler dışında farklı antimikrobiyal ajanlara da dirençli olma eğilimindedir (15). İnvaziv *K. pneumoniae* izolatlarında çoklu ilaç direnci Türkiye’de %46,1 olarak saptanmış, aynı sürveyans raporunda florokinolon direncinin %62,7; aminoglikozit grubu antibiyotiklerden gentamisin direncinin %49,2; tobramisin direncinin %79; amikasin direncinin %30 olduğu belirtilmiştir (40).

Çoklu ilaç dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisi fosfomisin, tigesiklin gibi son seçenek antibiyotiklere bağımlı hale gelmiş, günümüzde tedavi seçeneklerinin kısıtlılığı nedeniyle, terk edilmiş olan kolistin de tekrar kullanılmaya girmiştir. Ancak, bu antibiyotikler de direnç gelişimi nedeniyle etkisiz kalabilmektedir (3). *K. pneumoniae* enfeksiyonlarını tedavi etmekte kullanılan tüm ilaç gruplarına karşı dirençli izolatların varlığı gösterilmiştir. Çoklu ilaç dirençli ve özellikle karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarının artışı, klinikte tedavi seçeneklerini kısıtlı olması nedeniyle büyük öneme sahiptir (3, 41). Bu bakterilerin artışı az sayıda antibiyotiğin etkili olması ve bunların da yaygın ilaç dirençli veya

pan-ilacı dirençli gram negatif bakterilere etkisiz olması nedeniyle hem yerel hem de uluslararası tedavide sorunlara neden olmaktadır (5).

4.4. *K. pneumoniae*'de Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları

4.4.1. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

K. pneumoniae'de aktarılabılır beta-laktam direnci; beta-laktamaz enzimlerinin beta-laktam halkasının peptit bağıını hidrolize ederek ilacı etkisiz kılmasıyla oluşmaktadır (42).

4.4.1.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimleri, oksiminino beta laktam bileşikleri (sefuroksim, 3 ve 4.kuşak sefalosporinler ve aztreonam) dahil olmak üzere çoğu penisilin ve sefalosporini parçalayan enzimlerdir, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemezler (43). Çoğu GSBL, Ambler sınıf A enzimlerdir, aktif bölgede serin içerirler; beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam) ve diazabisiklooktanonlar (avibaktam) tarafından inhibe edilirler (44). Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırmasında grup 2be'de yer alırlar (45).

GSBL üreten bakteriler ilk olarak 1983'te üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanılmaya başlanmasından kısa süre sonra tanımlanmıştır ve dünya çapında raporlanmaktadır. Bu bakteriler, ilk olarak hastanelerde ardından bakımevlerinde görülmüş ve 2000li yıllardan itibaren toplumda rastlanmaya başlanmıştır. Bu enzimi üreten mikroorganizmaların klonal yayılımı ve plazmitler aracılığıyla yatay gen transferi GSBL üreten bakterilerin artışında önemli faktörlerdir. En önemli GSBL grupları, 2000'li yılların başında ortaya çıkan CTX-M, ardından SHV ve TEM türevlerinden oluşan GSBL'lerdir (46-49).

GSBL üretimi çoğunlukla *Enterobacteriaceae*'de görülmektedir. *E. coli* ve *K. pneumoniae*, GSBL üretimine en sık rastlanan türlerdir. Klinik izolatlarda, GSBL tipi dağılımı coğrafi değişkenlik göstermekte özellikle, Asya ülkeleri, Yunanistan, Türkiye ve Amerika Birleşik Devletleri yüksek risk içeren endemik alanlar kabul edilmektedir (5, 43).

İlk tanımlanan geniş spektrumlu beta laktamaz, Temoneria (TEM)-1 ve kısa süre sonra süfidril değişkeni (SHV)-1'dir. Bu enzimler, penisilinlere direnç oluşumuna neden olurken sefalosporinleri etkilemezler. Ancak, kısa süre sonra TEM ve SHV'den türeyen GSBL tipleri

tanımlanmıştır ve bu tipler minör aktif alan değişikliklerine sahip olmaları nedeniyle oksiiimino-beta-laktam antibiyotikleri parçalayabilmektedir. *bla_{SHV}* geni *K. pneumoniae*'de kromozomal olarak bulunmasının yanı sıra plazmit üzerinde de taşınabilirken, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{TEM}* genleri plazmid üzerinde yer alır, bu durum kolay aktarılabilir olmalarını sağlar (5). Sık görülen beta-laktamazlar TEM ve SHV tipindeyken, yıllar içerisinde özellikle CTX-M beta-laktamaz prevalansı artmaktadır (43). Bu enzimlerin, ifade düzeyleri, spesifik beta-laktamlara karşı aktiviteleri ve diğer direnç mekanizmalarının birlikteliği; GSBL pozitif izolatların farklı fenotiplerde ortaya çıkmasına neden olur (43, 50)

Klinik izolatlarda GSBL varlığı, enfeksiyon kontrolü amacıyla araştırılmaktadır. *Enterobacteriaceae* izolatlarında indikatör oksiiimino sefalosporinlere direnç varlığı durumunda fenotipik veya genotipik testlerle GSBL varlığı kesinleştirilmektedir (43).

K. pneumoniae'de sefotaksim ya da seftazidim; artmış dozda duyarlı (I) ya da dirençli (R) kategorisinde ya da sefpodoksim duyarlılığı R kategorisinde ise GSBL tanısının kesinleştirilmesi gereklidir. Bu amaçla, GSBL'nin in vitro inhibisyonunu temel alan fenotipik yöntemler kullanılabilir. Bu yöntemler, kombinasyon disk testi, çift disk sinerji testi, GSBL gradiyent test, sıvı mikrodilüsyon ve kolorimetrik testtir (43). Otomatize sistemler (VITEK®2 ESBL test, bioMerieux, Fransa; Phoenix ESBL test, Becton Dickinson, ABD; MALDI-TOF MS) GSBL tanısında kullanılabilir. Moleküler teknikler; polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), gerçek zamanlı PZR, yeni nesil dizileme teknolojileri, mikroarray yöntemi de kullanılabilir. Moleküler tekniklerden özellikle PZR, GSBL kodlayan genlerin tespitinde kullanılan standart yöntemdir (43).

4.4.1.2. AmpC Beta-Laktamazlar

Beta laktam grubu antimikrobiyallerden penisilinler, sefalosporinler (4. kuşak hariç) ve monobaktamları AmpC tipi sefalosporinazlar parçalar, bu enzimler Ambler sınıflamasında C sınıfında bulunurken Bush fonksiyonel sınıflamasında grup 1'de yer alırlar (43-45). AmpC tipi beta-laktamaz enzimleri, klavulanik asit gibi klasik GSBL inhibitörleri tarafından zayıf inhibe edilirler (51).

Edinilmiş AmpC taşıyan izolatlar ilk olarak 1980'li yıllarda tanımlanmıştır. İzolatların klonal yayılımı ve AmpC'nin plazmid aracılı yatay transferi ile tüm dünyaya yayılmıştır. Taşınabilir AmpC genlerinin kaynağı, bu enzimin doğal üreticileridir. Günümüze kadar birkaç AmpC enzim ailesi tanımlanmıştır. Bu aileler; *Enterobacter* grubu (MIR, ACT), *Citrobacter*

freundii grubu (CIT: CMY-2-benzeri, LAT, CFE), *Morganella morganii* grubu (DHA), *Hafnia alvei* grubu (ACC), *Aeromonas* grubu (CMY-1-benzeri, FOX, MOX) ve *Acinetobacter baumannii* grubu (ABA)'dır. CMY-2-benzeri enzimler prevalansı en yüksek ve en yaygın gruptur. Bunun yanı sıra indüklenebilir DHA-benzeri beta-laktamazlar ve bazı diğer AmpC enzimleri de yaygınlaşmıştır (51).

K. pneumoniae kazanılmış AmpC enzimlerinin ana üreticilerinden biridir (51). AmpC enzimleri yaygın olarak görülmelerine ve çoklu merkezli çalışmalarda üçüncü kuşak sefalosporin dirençli izolatlarda raporlanmalarına rağmen prevalansları GSBL'lerin çok altındadır (52).

Doğal AmpC üreticileri, bu enzimi sürekli eser miktarda ya da indüklenerek üretebilirler. Genetik değişimler sonucunda doğal AmpC'nin derepresyonu ya da artmış üretimi sonucunda yüksek düzey sefalosporin ve beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü direnci ortaya çıkar. Edinilmiş AmpC genleri, birkaç indüklenebilir tip dışında sürekli ifade edilir ve doğal AmpC üreticilerinin dereprese ya da aşırı AmpC üreten mutantlarına benzer direnç paterni oluştururlar. Direnç düzeyi, enzimin ifade düzeyine ve diğer direnç mekanizmalarının varlığına bağlıdır (51-53).

İzolatlarda, sefoksitin direncinin yanında sefotaksim ya da seftazidim direnci saptandığında edinsel AmpC enzimlerinin araştırılması önerilmektedir (54). Fenotipik AmpC tanı testleri kloksasilin ya da boronik asit kullanılarak AmpC'nin inhibe edilmesi temeline dayanmaktadır (55). 'In-house' yöntemler ya da Mast 'AmpC Detection Disc Set', bioMérieux AmpC gradient test, sefotaksim-kloksasilin ve seftazidim-kloksasilin içeren Rosco tabletleri kullanılabilecek ticari kitlerdir (56-59). Edinilmiş AmpC varlığı, PZR temelli yöntemler veya DNA-mikrodizilimi temelli yöntem ile tanımlanabilir (60, 61).

4.4.1.3. Karbapenemazlar

Karbapenemazlar; penisilinleri, çoğunlukla sefalosporinleri ve değişken miktarlarda karbapenemleri ve monobaktamları parçalayan enzimlerdir. Monobaktamlar metallo-beta-laktamazlar tarafından hidrolize edilmez. Ambler sınıf A, B ve D'de yer alan karbapenemazlar tanımlanmıştır (44). Avrupa'da karbapenemazların yayılması, 1990'ların ikinci yarısında Akdeniz ülkelerinde özellikle *P. aeruginosa*'da başlamıştır. 2000'lerin başında Yunanistan'da ilk olarak Verona integron-encoded metallo-beta-laktamaz (VIM) ardından, *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) üreten *K. pneumoniae* salgını ortaya çıkmıştır (62). OXA-48

karbapenemaz üreten bakteriler ise Avrupa ülkelerinde hızla yayılmaktadır (6, 63). Hindistan ve Orta Doğu'da yüksek prevalansa sahip New-Delhi metallo-beta-laktamazlar (NDM) da sorun oluşturan karbapenemaz tiplerindendir, IMP karbapenemazlar, bazı bölgelerde yaygındır (64).

Karbapenemazların çoğu, plazmid üzerinde kodlanan edinsel enzimlerdir. Karbapenemazların ekspresyon düzeyleri, tiplerinin biyokimyasal özellikleri ve spesifik beta-laktamlara karşı aktiviteleri değişkenlik göstermektedir. Diğer direnç mekanizmaları ile birliktelik gösterdiklerinde çok farklı direnç fenotipleri oluşumuna neden olmaktadır (65). Karbapenemaz üreticilerinin çoğu genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere de dirençlidir bununla birlikte OXA-48-benzeri enzimleri üretenler sefalosporinlere tamamen duyarlı olabilir. Ancak, karbapenemaz üreticilerinin çoğu aynı zamanda CTX-M gibi sefalosporinleri parçalayan enzimleri de taşıdığından sefalosporin direnci de eşlik etmektedir (66).

Enterobacteriaceae ailesinde karbapenem direncinin bir diğer mekanizması GSBL veya AmpC enzimleriyle birlikte porin değişiklikleri ile hücre geçirgenliğinin azalmasıdır (67).

Karbapenemaz üretiminin taranmasında, en iyi duyarlılık ve özgüllüğe sahip olması nedeniyle meropenem epidemiyolojik sınır değerleri (epidemiological cut off value, ECOFF) kullanılmaktadır. İmipenem ve ertapenem daha düşük özgüllüğe sahiptir. Tarama testinde, meropenem MİK değeri $>0,12 \mu\text{g/mL}$ ya da zon çapı 25 mm altında ya da meropenem (10 μg) zon çapı 25-27 mm arasındayken piperasilin tazobaktam/temosilin direnci bulunan izolatlar karbapenemaz üretimi açısından değerlendirilmelidir. Bu amaçla, meropenem ve farklı inhibitörleri içeren kombinasyon disk testi (MAST, İngiltere; Rosco, Danimarka), karbapenemlerin hidrolizi temeline dayanan kolorimetrik testler (Carba NP, Blue-Carba test, β CARBA test™), karbapenem hidrolizini tespit eden karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM), MALDI-TOF MS ve immünokromatografik lateral akım testleri kullanılır (43, 66).

4.4.2. Aminoglikozit Grubu Antimikrobiyallere Direnç

Aminoglikozitlere direnç oluşumuna neden olan mekanizmalar; kromozomal ya da plazmit üzerinde taşınan aminoglikozit değiştirici enzimler (aminoglikozit fosforil transferaz; *aph*, aminoglikozit asetil transferaz; *aac*, aminoglikozit nükleotidil transferaz; *ant*), ribozomal bağlanma bölgelerinin değişikliğine neden olan ve plazmitlerle taşınan edinsel 16S rRNA metiltransferaz enzimleri, porin genlerinin ifadesinin azalması ve dışa atım pompalarıdır (7).

Bu mekanizmaların arasında, en sık aminoglikozit değiştirici enzimlere bağlı direnç görölmektedir. Bu enzimlerin arasında *aac(3)-II* ve *aac(6')-Ib K. pneumoniae*'de ilk sıradadır (7).

Diğer bir önemli direnç mekanizması olan 16S rRNA metiltransferazlar, ilk olarak 1990ların sonunda ortaya çıkmış ve *Enterobacteriaceae* ailesinde tüm dünyada tanımlanmıştır. *armA*, *rmtA-rmtH* ve *npmA* tanımlanan 16 S rRNA metiltransferaz enzimlerini kodlayan genlerdir (7, 68). Bu enzimler, klinikte kullanılan tüm aminoglikozitlere yüksek düzey direnç oluşumundan sorumludur. 16 S rRNA metiltransferazlar dünyanın farklı bölgelerinde değişen oranlarda saptanmaktadır (69). *Enterobacteriaceae* ailesinde bu oran, Belçika'da %0,12 iken; Çin'de %3,9'dur (70, 71). *armA* ve *rmtB* Asya'da en yaygın genlerdir, İngiltere ve İrlanda'da *armA*, *rmtC* ve *rmtF* en sık görölenlerdir (68).

4.4.3. Kinolon Grubu Antimikrobiyalere Karşı Direnç

Kinolon direncinin mekanizmaları; plazmit aracılı direnç genlerinin varlığı, dışa atım pompaları, porinler veya hedef enzimleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar ile ilişkilidir. *Enterobacteriaceae* ailesinde üç tip plazmid ilişkili kinolon direnç mekanizması tanımlanmıştır. Bu mekanizmalar, topoizomera koruma proteinleri (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), asetilasyon enzim varyantı (*aac(6')-Ib-cr*) ve çoklu ilaç direnci efluks pompasıdır(*qepA*) (72-74).

Bu genler minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin altında, düşük düzey kinolon direnci oluştururlar. Bu durum, klinik olarak direnç oluşturmasa da bu genetik bölgeler GSBL genleri ile aynı plazmid üzerinde bulunduklarından ve yatay olarak yayılabildikleri için prevalansları önemlidir (8, 75).

Plazmit aracılı mekanizmalardan, *qepA*, dışa atım pompalarıı ifade ederek florokinolonların hücre dışına atılmasını sağlar (74). *aac(6')-Ib-cr*, kinolonları, piperazinil halkasındaki amino azotu asetile ederek inaktive eder (73). *qnr* ise topoizomera koruma proteinleri ile ilişkilidir ve kinolonların etkisinden korur (72).

Çocuk hastalarda kıkırdak üzerindeki etkisi nedeniyle kullanımı sınırlandırılmış olsa da florokinolon direnç genleri çocuk yaş grubundaki hastalardan izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde de sıklıkla bulunmaktadır (76).

4.4.4. Kolistine Karşı Direnç

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde ciddi nefrotoksisiteleri nedeniyle terk edilmiş olan polimiksin grubundan kolistin, çoklu ilaç direnci nedeniyle çocuk yaş grubunda da sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Kolistine karşı direnç oluşumunda en yaygın mekanizma lipopolisakkarit değişiklikleri ile bakteriyel dış membranın değişiklik göstermesidir. Dışa atım pompalarının ifadesinin artması ve kapsül polisakkariti sentezinin artması ile porin kaybı diğer mekanizmalardır (9).

Lipopolisakkarit değişiminde birçok gen ve operon rol alır. Bunlar; lipopolisakkarit değişikliğinde doğrudan rolü olan enzimleri kodlayan *pmrC*, *pmrE* genleri ve *pmrHFIJKLM* operonu; düzenleyici iki komponent sistemleri PmrAB ve PhoPQ, PmrAB sistemini düzenleyen *crrAB*, iki komponent sistemlerinin negatif düzenleyicisi *mgrB*, plazmit ilişkili mobil kolistin direnci (*mcr*) genleri, kapsül biyosentezinin artışı düzenleyen Cpx ve Rcs ve dışa atım pompası aktivatörü KpnEF'dir (77-81).

mgrB geninin inaktivasyonu *K. pneumoniae*'de kolistin direncinin gelişiminde en yaygın mekanizma olarak görülmektedir. Kırk yedi aminoasitlik küçük bir transmembran proteinini kodlayan bu genin, mutasyon/inaktivasyonu *phoPQ* operonunun aktivitesini artırarak *pmrHFIJKLM* operonunun aktifleşmesine neden olur ve katyonik L-arabinozaminin lipit A'ya eklenmesi sonucunda lipopolisakkarit değişimi ile kolistin direnci oluşur (82, 83). Bu gende, delesyon, nonsense, missense ve insersiyonel mutasyonlar raporlanmıştır. *mgrB* geninin farklı noktalarına insersiyon sekansı yerleşmesiyle inaktivasyonu sıklıkla gösterilmiştir (83-86).

Plazmit ilişkili kolistin direnç geni *mcr*, tek aktarılabılır kolistin direnç mekanizmasıdır, bu durum direncin bakteriler arasında yayılımını kolaylaştırmaktadır. Bu plazmit ilişkili genler ilk olarak 2015'te Çin'de domuzlardan izole edilmiştir (87). *mcr* geninin ifadesi ile lipit A'ya katyonik fosfoetanolamin eklenir ve lipopolisakkarit değişimi kolistin direnci oluşur. *mcr-1* genini taşıyan izolatların minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerlerinin 4-8 kat arttığı çalışmalarda gösterilmiştir. Aktarılabılır kolistin direnci Avrupa, Asya, Amerika ve Afrika'da gösterilmiş ve *Klebsiella* cinsi dahil birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde tanımlanmıştır (9). *mcr-1* genini taşıyan bazı plazmitlerin üzerinde beta-laktam, aminoglikozit, kinolon, sulfonamidler, tetrasiklinler ve fosfomisin direnci ile ilişkili genler de gösterilmiştir. Günümüze kadar, *mcr-1* varyantları (*mcr-1.0* – *mcr-1.30*), *mcr-2* varyantları (*mcr-2.1* – *mcr-2.7*), *mcr-3* (*mcr-3.1* – *mcr-3.41*), *mcr-4* (*mcr-4.1* – *mcr-4.6*), *mcr-5* (*mcr-5.1* – *mcr-5.4*), *mcr-6* (*mcr-6.1*), *mcr-7* (*mcr-7.1*), *mcr-8* (*mcr-8.1* – *mcr-8.5*), *mcr-9* (*mcr-9.1* – *mcr-9.3*) ve son olarak *mcr-10*

(*mcr-10.1*) varyantı tanımlanmıştır. Bu plazmit ilişkili *mcr* gen varyantlarının sayısındaki hızlı artış, son birkaç yılda ciddi bir halk sağlığı sorunu oluşmasına yol açmıştır. *mcr-1* dışındaki *mcr* genlerinin dağılımı ile ilgili yeterli veri bulunmamaktadır (9).

K.pneumoniae'de kolistin direnci Türkiye'de ilk kez 2012 yılında tanımlanmıştır (88). UAMDSS 2016 sürveyans raporuna göre ülkemizde karbapenem dirençli 1229 *K.pneumoniae* izolatında kolistin direnci % 31,7 olarak saptanmıştır (40).

4.5. *K. pneumoniae*'nin Kapsül Özellikleri

K. pneumoniae'nin polisakkarit yapısındaki kapsülü majör bir virülans faktörü ve epidemiyolojik belirteçdir. Hücrenin en dışında yer alan polisakkarit kapsül, bakteriyi kuruluktan, faj ve protistalardan korur (89). Hayvan deneylerinde kapsülsüz suşların enfeksiyon oluşturmadağı gösterilmiştir (90, 91). Ek olarak, kapsül konağın immün yanıtını baskılamakta; antimikrobiyal immünpeptitlere, kompleman aracılı öldürmeye, fagositoza direnç sağlamaktadır (92-95). Seroloji ile belirlenmiş, immünolojik olarak farklı 77 *Klebsiella* kapsül tipi (K-tipi) bulunmaktadır (96-98). Serolojik tiplendirmenin her yerde ulaşılabilir olmaması ve özel teknikler gerektirmesi nedeniyle kapsül tiplendirme nadiren yapılmaktadır. Dahası, *K. pneumoniae* izolatlarının %10-70'i daha önce tanımlanmamış bir kapsül eksprese etmeleri ya da kapsülsüz olmaları nedeniyle serolojik olarak tiplendirilebilir değildir. Bu durum, kapsül epidemiyolojisine ilişkin bilginin de yetersizliğine yol açmaktadır (99, 100).

Kapsül sentezi ile ilişkili genler kapsül sentezi lokusunda (K-lokus) bulunmaktadır. Bu lokusun uç kısımlarında kapsül biyosentez mekanizmasını kodlayan bir dizi ortak gen (örn. *galF*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc*, *gnd*, *ugd*) bulunur. Lokusun merkezi kısmı ise oldukça değişkendir. Kapsüle özgü şeker sentezi ile ilişkili proteinleri, dışa atım proteinlerini, çekirdek montaj bileşenleri olan flippazı (*wzx*) ve kapsül tekrarlayan ünite polimerazı (*wzy*) sentezler (101).

Günümüzde 77 K-tipi referans suşu da dahil olmak üzere birçok *K. pneumoniae* izolatının K-lokusunun nükleotit dizisine ulaşılabilir (102). Serolojik tanımlamaya göre teknik olarak daha kolay ve ayırt edici bir dizi moleküler kapsül tiplendirme yöntemi de tanımlanmıştır. Bu yöntemlerden bazıları; restriction fragment length polimorfizm (RFLP), *wzi* ve *wzc* tiplendirme, PZR temelli kapsüle özgü *wzy* tiplendirme (103-105). *wzi* şemasında alleller spesifik K-tipleri ile ilişkilendirilmiştir (104). *wzc* şemasında ise, K-tipleri referans bir diziye benzerlik düzeyine göre belirlenir (105). Bu yöntemlerden hiçbirisi yaygın olarak benimsenmese de *wzi* ve *wzc* tiplendirme şemaları ilgi görmektedir (106-108) Ancak, bu

yöntemlerle de izolatların büyük bir bölümü tiplendirilemediğinden *K. pneumoniae*'nin kapsül çeşitliliği bilinmemektedir. Tüm genom dizileme analizleri, K-lokusunun tümünü ortaya çıkararak *K. pneumoniae*'nin epidemiyolojik sürveyansının belirlenmesine yardımcı olmaktadır (109).

4.6. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Epidemiyolojik tiplendirme yöntemleri, izolatların klonal ilişkisini, kaynağını ve yayılım şeklini saptamada önemlidir. Fenotipik ve genotipik tiplendirme yöntemleri Tablo 4.2'de özetlenmiştir (110).

Tablo 4.2. Epidemiyolojik Tiplendirme Yöntemleri

Fenotipik Yöntemler	Genotipik yöntemler	
Biyotiplendirme Serotiplendirme Bakteriyofaj tiplendirmesi Bakteriyosin tiplendirmesi Antibiyotiplendirme Multilokus enzim elektroforezi Kütle spektrometri Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi	<u>Plazmit temelli tiplendirme yöntemleri</u>	<u>Kromozomal DNA temelli tiplendirme yöntemleri</u>
	Plazmit-‘restriction fragment length polimorfizm (RFLP)’ Plazmit uyumsuzluk tiplendirmesi (incompatibility typing) Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) temelli replikon tiplendirme Plazmit temelli multilokus sekans tiplendirme (pMLST)	Restriction fragment length polimorfizm (RFLP) Ribozomal DNA RFLP analizi (ribotiplendirme) Pulsed field jel elektroforezi (PFGE) PZR temelli tiplendirme yöntemleri: -PZR-RFLP -‘Arbitrary primed’-PZR (AP-PZR) -‘random amplified polymorphic DNA’ (RAPD) -rep-PZR -‘Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus’ (ERIC) -‘DNA amplification fingerprinting’ (DAF) -‘Amplified fragment length polymorphism’ (AFLP) PZR Dizi temelli tiplendirme yöntemleri: -‘Single-nucleotide polimorphisms’ (SNPs) -‘Single-Locus Sequence Typing’ (SLST) -‘Multilocus Sequence Typing’ (MLST) -‘High-Density DNA array’ ve DNA çipleri -Tüm genom dizileme

K. pneumoniae izolatlarının genetik tiplendirmesi; salgın araştırmalarında, kaynağın araştırılmasında, bulaş yollarının anlaşılmasında ve hastane enfeksiyonlarının yönetiminde önemlidir. Bu amaçla, fenotipik ve moleküler yöntemler kullanılabilir. Fenotipik yöntemler geçmişte uzun süre kullanılmıştır. Günümüzde hala değişik düzeylerde kullanılmaktadır. Ancak, aşırı iş yükü, uzun zaman alma, değişken sonuçlar verme ve ayırım güçlerinin yetersizliği gibi önemli eksiklikleri bulunmaktadır. Bu sorunlar nedeniyle 1980’li yıllardan itibaren moleküler yöntemler bakterilerin tiplendirilmesinde kullanılmaya başlanmıştır. Tiplendirmede kullanılacak ideal bir yöntem yoktur. Yöntemin epidemiyolojik olarak ilişkili suşları ortak bir klonda, ilişkisiz olanları özgün DNA profilinde sınıflandırabilme yeteneği

(ayırım gücü) ile sonuçlarının laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği, kullanılan göstergenin zaman içerisindeki değişim hızı, yöntemin geçerli ve güncel olması, sonuçlarının uluslararası veri bankalarında depolanabilmesi ve ufak değişikliklerle değişik mikroorganizmalara uygulanabilmesi bu yöntemler tercih edilirken dikkate alınması gereken bazı özelliklerdir (111).

Tiplendirme yöntemlerinden pulsed field jel elektroforezi (PFGE)'nin ayırım gücü yüksektir ve *Klebsiella* izolatlarının karakterize edilmesinde kullanılan altın standart yöntemdir (112). PFGE yönteminin dezavantajı, tekniğinin zor olmasıdır. Multilokus sekans tiplendirme (MLST) izolatların tiplendirilmesi ve klonal ilişkilerinin belirlenmesinde açık ve karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmesini sağlar. MLST sonuçları sayısal olarak tanımlanır. MLST yönteminde *K. pneumoniae*'ye ait yedi 'housekeeping' gen bölgesi çoğaltılır ve bu dizilerdeki değişiklikler özgün alleller olarak tanımlanır. Bu yedi allel, izolatın sekans tipi (ST) olarak bilinen allelik profilini oluşturur (113). Bu yöntemin dezavantajı, salgın analizinde yeterince tanımlayıcı olmamasıdır ancak küresel epidemiyolojinin değerlendirilmesinde yardımcıdır (5).

4.6.1. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE ilk kez 1983 yılında tarif edilmiş ve kısa bir sürede moleküler epidemiyolojik analizler arasında "altın standart" haline gelmiştir (112). PFGE yönteminde geleneksel DNA eldesi yöntemlerinden farklı olarak kırılmamış bütün kromozomal DNA kullanılır. Bütün DNA elde etmek amacıyla; bakteriler düşük erime sıcaklığına sahip agaroz ile karıştırılarak kalıp oluşturulur. Agaroz kalıbı hazırlandıktan sonra bakterilerin hücre duvarları, enzim ve deterjanların yardımıyla parçalanır. Agaroz içerisinde saf ve bir bütün halinde kalan kromozomal DNA, restriksiyon enzimi kullanılarak kesilir. Bakteriler arasındaki epidemiyolojik ilişkinin değerlendirilebilmesi için enzim DNA'yı uygun bir sayı (10'dan az 25-30'dan fazla olmamalı) ve büyüklükte kesmelidir. Kesme işleminden sonra agaroz dilimleri tarak dişine yerleştirilir ve çevresine jel dökülür. Hazırlanan elektroforez jeli, belirli aralıklarla yönü değiştirilen elektrik akımını sağlayan elektroforez düzeneğine konularak 10–2000 kb uzunluğundaki DNA parçalarının ayrılması sağlanır. Elektroforez işleminden sonra jel, etidyum bromidle boyanarak, bant profilleri görünür hale getirilmektedir (114).

Tenover ve ark. çalışmalarına göre, PFGE sonuçları, elde edilen paternlerdeki bant sayısı farkı ve yerleşim yerine bakılarak yorumlanmakta ve izolatların epidemiyolojik ilişkileri değerlendirilmektedir. Buna göre izolatlar; aynı izolat, yakın ilişkili izolat, muhtemelen yakın

ilişkili izolat ve ilişkisiz izolat olarak sınıflandırılmaktadır; izolatlar arası ilişkinin değerlendirilmesinde gözle değerlendirme sağlayan Tenover kriterleri ve çeşitli yazılım programları kullanılmaktadır (112):

Aynı izolat: PFGE’de sayı ve büyüklükleri aynı bant paterni sergileyen bakterilerin genetik olarak aynı ve epidemiyolojik olarak ilişkili oldukları kabul edilmektedir. Tek bant farklılığı gösteren izolatların da klonal olarak ilişkili oldukları gösterilmiştir.

Yakın ilişkili izolat: Tek bir nokta mutasyon, insersiyon veya delesyon oluşması nedeniyle aralarında 2-3 bant farkı oluşan izolatlar yakın ilişkili olarak değerlendirilmekte ve epidemiyolojik olarak salgının bir parçası oldukları kabul edilmektedir.

Muhtemel ilişkili izolat: İnsersiyon veya delesyon ile restriksiyon bölgelerinin kazanımı veya kaybı gibi iki bağımsız genetik değişiklik meydana geldiğinde aralarında 4–6 bant farkı olan izolatlar oluşmaktadır. Çok sayıda hastanın kullanıldığı ve 3-6 aydan uzun bir süreyi kapsayan çalışmalarda bu gibi izolatlar sıklıkla gözlenebilmektedir. Bu tür izolatlar muhtemel ilişkili izolatlar olarak değerlendirilmektedir. Ancak genetik olarak yakın ilişkili kabul edilmediklerinden, epidemiyolojik olarak ilişkili olma olasılıkları daha düşüktür.

İlişkisiz izolat: DNA’sında meydana gelen üç ya da daha fazla genetik değişiklikten dolayı 7 ya da daha fazla bant farkı sergileyen bakteriler epidemiyolojik olarak ilişkisiz izolatlar olarak kabul edilmektedir.

4.6.2. Multilokus Sekans Tiplendirme (MLST)

MLST, bakteri izolatları arasındaki genetik ilişkileri ortaya koymak için kullanılan nükleotit dizisi tabanlı bir yöntemdir (115). Çok kullanıcıli uluslararası veri tabanlarının uygulanmasına izin veren açık ve taşınabilir veriler sağlar (116, 117).

Primer çiftleri, yedi ‘housekeeping’ geninin iç bölümlerinin PZR ile çoğaltılması ve dizilenmesi için tasarlanmıştır. Bu genler, kromozom üzerinde birbirlerine uzak bölgelerde bulunmaları, PZR primerlerinin mevcut olması veya *tonB* için bilinen nükleotid varyasyonlarına göre seçilmiştir. Bu lokuslarda her farklı diziye farklı bir allel numarası verilmiş ve her allel kombinasyonuna ayrı bir sekans tipi (ST) numarası verilmiştir (113).

K. pneumoniae suşlarının moleküler karakterizasyonu ile yaygın çoklu ilaç dirençli klonlar tanımlanmıştır. Çoklu ilaç direnci yüzlerce farklı *K. pneumoniae* klonunda ortaya çıkmıştır. Bu klonların bazıları sadece bir sağlık hizmeti merkezinde salgın oluşturarak yerel sorunlara yol açarken, bazı klonlar küresel sorun haline gelmiştir. Dünyada geniş yayılım gösteren ve çoklu ilaç dirençli salgınlara yol açan kökenlerden CG (klonal grup) 15, CG20(CG17), CG29, CG37, CG147, CG101(CG43) ve CG307 bu klonal gruplara örnektir. Üçüncü kuşak sefalosporin ve/veya karbapenem dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının büyük bir kısmı az sayıda klon tarafından oluşturulmaktadır. Örneğin, Avrupa’da karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’nin %57’si ST11, ST15, ST101 veya ST258/ST512 klonlarına aittir (4).

Çoklu ilaç dirençli suşlar hastane içerisinde yerleştikten sonra, hastane içinde ve hastaneler arasında çoğalarak yayılabilir. Çoklu ilaç dirençli izolatlarda, direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu ve izolatların moleküler tiplendirilmesi, günümüzdeki direnç profilleri ve bulaş yollarının belirlenmesine ışık tutacaktır. Yerel klonların genetik belirteçleri kazanması ya da yayılım gösteren uluslararası klonların tanımlanmasıyla *K. pneumoniae* izolatlarında çoklu ilaç direncinin artışı tedavinin olumsuzluğuna yol açmaktadır. *K. pneumoniae*’de bulunan direnç genlerinin çeşitliliği ve sayısının artması, büyüyen direnç geni havuzunun göstergesidir. *K. pneumoniae* epidemiyolojisi ve klinikle ilişkili genetik varyasyonlarının evriminin anlaşılması, patojenite/virülans ve çoklu ilaç direnci mekanizmalarının aydınlatılması için yapılan çalışmaların planlanması, yorumlanması ve etkili kontrol stratejilerinin oluşturulması için önemli bir anahtardır (5).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi, Tiplendirilmesi ve Saklanması

Çalışmamızda, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım ve Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitelerinden gönderilen klinik örneklerden üremiş ve MALDI-TOF MS (Becton Dickinson, ABD; VITEK MS, BioMérieux, Fransa) ile *Klebsiella* türleri olarak tanımlanmış izolatların moleküler epidemiyolojik özellikleri araştırılmıştır. Etik kurul onay tarihinden itibaren (12/11/2020) Cebeci Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen örneklerden üreyen izolatların belirlenmesine ve saklanmasına başlanmış, bir yıl süreyle örnek toplanmıştır.

Klebsiella türleri olarak tanımlanan izolatlardan aşağıdaki ölçütlere uyanlar çalışmaya dahil edilmiştir:

1. Örnek alındığı sırada hasta, Çocuk Hastalıkları Yoğun Bakım ya da Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesinde yatıyor olmalıdır.
2. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) disk zon çaplarından herhangi biri European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Antimikrobiyal Duyarlılık Sınır Değerlerine göre dirençli kategoride olmalıdır ya da disk difüzyon testi sonucuna göre karbapenemler duyarlı kategoride olsa da EUCAST tarafından karbapenemaz üretimi açısından taranması önerilen izolatlar (Meropenem (10 µg) diski zon çapı 25 mm altında olanlar ya da meropenem (10 µg) diski zon çapı 25-27 mm olmasının yanında piperasiline-tazobaktam direnci bulunanlar) grubunda bulunmalıdır (43, 118).

Çalışma ölçütlerine uygun bakteri kolonileri %5 koyun kanlı agarda (KKA) (Becton Dickinson, ABD) üretilmiş, 1ml %10 gliserol ilave edilmiş buyyonda -20°C'de saklanmıştır.

5.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilecek izolatlar belirlendikten sonra, bu izolatların penisilin ve sefalosporin duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile, karbapenem, aminoglikozit ve kinolon minimum inhibitör konsantrasyonları (MİK) gradient şerit testi ile, kolistin MİK değerleri sıvı

mikrodilüyon yöntemi ile belirlenmiştir. Sonuçlar, EUCAST Antimikrobiyal Duyarlılık Sınır Değerleri tablosu kullanılarak yorumlanmış ve duyarlılık kategorileri belirlenmiştir (118).

5.2.1. Disk Difüzyon Yöntemi

KKA kullanılarak canlandırılan izolatlar, fizyolojik tuzlu su (FTS) içerisinde nefelometre (Biosan, Türkiye) ile 0,5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanmış, Müller Hinton agar (Becton Dickinson, ABD) üzerine eküvyon ile üç yönde yayılmış, üzerine antimikrobiyal diskleri (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirilmiştir (Tablo 5.1). 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda koyu renk zemin üzerinde ve yansıtılmış ışıkla aydınlatılmış ortamda disk zon çapları ölçülmüştür. Disklerin çevresinde oluşan inhibisyon zon çaplarına göre izolatlar; duyarlı (S), artmış dozda duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak EUCAST tarafından belirlenen öneriler doğrultusunda değerlendirilmiştir (118, 119).

Tablo 5.1. Disk difüzyon yönteminde Enterobacterales takımı için kullanılan antimikrobiyal duyarlılık testi zon çapları sınır değerleri

Antimikrobiyal sınıfı	Antimikrobiyal adı ve disk içeriği (µg)	S(duyarlı)≥	R(dirençli)<
Beta laktam-Beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları	Amoksisilin-klavulonat (20-10)	19 mm	19 mm
	Piperasilin-tazobaktam (30-6)	20 mm	20 mm
Sefalosporinler	Sefoksitin (30)	19 mm	19 mm
	Sefotaksim (5)	20 mm	17 mm
	Seftazidim (10)	22 mm	19 mm
	Sefepim (30)	27 mm	24 mm

5.2.2. Gradyent Şerit Test Yöntemi

KKA kullanılarak canlandırılan izolatlar FTS içerisinde nefelometre (Biosan, Türkiye) ile 0,5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanmış, Müller Hinton agar (Becton Dickinson, ABD) üzerine eküvyon ile üç yönde yayılmış, üzerine antimikrobiyal şeritler (Bioanalyse, Türkiye) yerleştirilmiştir (Tablo 5.2). 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresinin sonunda, koyu renk zemin üzerinde ve yansıtılmış ışıkla aydınlatılmış ortamda inhibisyon zonunun şeridi kestiği yerdeki MİK değeri okunmuştur. MİK değerlerine göre izolatlar; S, I ve R olarak EUCAST tarafından belirlenen MİK değerleri kullanılmıştır (Tablo 5.2) (118).

Tablo 5.2. Enterobacterales takımı için kullanılan minimum inhibitör konsantrasyon sınır değerleri

Antimikrobiyal sınıfı	Antimikrobiyal adı	S $\geq$ (μ g/mL)	R< (μ g/mL)
Karbapenemler	Ertapenem	0,5	0,5
	İmipenem	2	4
	Meropenem	2	8
Kinolonlar	Siprofloksasin	0,25	0,5
	Levofloksasin	0,5	1
Aminoglikozitler	Amikasin	8	8
	Tobramisin	2	2
	Gentamisin	2	2

5.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yöntemi

KKA kullanılarak canlandırılan izolatlar, FTS içerisinde nefelometre (Biosan, Türkiye) ile 0,5 McFarland bulanıklığa ayarlanmıştır. Sensititre Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth w/TES (Thermo Fisher Scientific, ABD) besiyerine 10 μ L aktarılmış ve Sensititre FRCOL mikropak (Thermo Fisher Scientific, ABD) üzerindeki kuyucuklara 50 μ L olacak şekilde dağıtılmıştır. 37°C’de 18 saat, atmosferik koşullarda inkübasyon sonrasında kuyucuğun içinde üreme görülmeyen en düşük kolistin konsantrasyonu (mg/L), MİK değeri olarak belirlenmiştir. Duyarlılık kategorilerinin belirlenmesi için MİK değerleri EUCAST antimikrobiyal duyarlılık sınır değerleri tablosuna göre MİK $\geq$ 4 μ g/ml R, MİK<4 μ g/ml S olarak değerlendirilmiştir (118).

5.3. Karbapenemaz Üretiminin Taranması

İzolatların karbapenemaz üretiminin taranmasında, karbapenem inaktivasyon metodu (CIM) kullanılmıştır (120). Meropenem (10 μ g) diski (Bioanalyse, Türkiye) ile bir öze dolusu test edilen bakteri, 450 μ L distile su içerisinde steril tüpte 2 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Nefelometre cihazı (Biosan, Türkiye) kullanılarak 0,5 McFarland standardına uygun meropeneme duyarlı *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun, Müller Hinton agara (Becton Dickinson, ABD) eküvyonla yoğun ekimi yapılmıştır. Bakteri ile inkübe edilmiş olan meropenem diski tüpten çıkarılarak bu agarın ortasına yerleştirilmiş, 18 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Test sonucuna göre karbapenemaz üretimi saptanmayan (meropenem diski çevresinde inhibisyon zonu oluşumu görülen) ve karbapenem zon çapları duyarlı (S) kategorisinde olan izolatlar çalışmanın ilerleyen aşamalarına dahil edilmemiştir.

5.4. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarından DNA Elde Edilmesi

K. pneumoniae'nin her izolatu stoktan KKA besiyerine tek koloni düşürme tekniği ile pasajlanarak 37°C'de 18 saat inkübe edilmiş, DNA eldesi ve saflaştırma işlemi QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerileri doğrultusunda yapılmıştır. İşlem sonunda elde edilen DNA'nın miktarı nanofotometre (Implen, Almanya) ile ölçülmüş ve DNA 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerinde -20°C'de saklanmıştır.

5.5. Antimikrobiyal Ajanlara Dirençten Sorumlu Gen Bölgelerinin PZR ile Saptanması

PZR reaksiyon karışımlarında, *Taq* DNA polimeraz (*Taq* DNA polymerase 500U, 5U/μL, Thermo Fisher Scientific, ABD), *Taq* tamponu (10X *Taq* Buffer with (NH₄)₂SO₄, Thermo Fisher Scientific, ABD), MgCl₂ (25 mM MgCl₂, Thermo Fisher Scientific, ABD) dNTP karışımı (10mM dNTP mix, Thermo Fisher Scientific, ABD) ve primerler (Sentebiolab Biyoteknoloji, Türkiye) kullanılmıştır. PZR reaksiyonları ısı döngü cihazında (TC412, Techne, Birleşik Krallık) gerçekleştirilmiştir.

5.5.1. GSBL Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Beta laktam antibiyotiklere dirence yol açan GSBL genleri; *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}; için üç ayrı reaksiyon gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonlarda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.3'te verilmiştir (121,122).

Tablo 5.3. GSBL için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Enzim tipi	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	bç
TEM	TEM/F: GAA GAC GAA AGG GCC TCG TG	1074 bç
	TEM/R: GGT CTG ACA GTT ACC AAT GC	
SHV	SHV/F: CGC CGG GTT ATT CTT ATT TGT CGC	1016 bç
	SHV/R: TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA	
CTX-M	CTX-MA: CGC TTT GCG ATG TGC AG	550 bç
	CTX-MB: ACC GCG ATA TCG TTG GT	

Not: Taşlı ve ark. ve Bonnet ve ark.'nın çalışmasından alınmıştır. (121,122).

Her bir PZR için reaksiyon karışımları ve döngü koşulları aşağıda verilmiştir.

SHV için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 35,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 5 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

SHV/F primer (10 pmol)--- 1 µl

SHV/R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

TEM için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 35,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 5 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

TEM/F primer (10 pmol)--- 1 µl

TEM/R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

CTX-M için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 35,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 5 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

CTX-M/F primer (10 pmol)--- 1 µl

CTX-M/R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

SHV için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 5 dk
Denatürasyon--- 94 °C, 30 sn
Primer yapışması--- 66 °C, 30sn
Uzama--- 72 °C, 50 sn
Son uzama--- 72 °C, 10 dk

} 30 döngü

TEM için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94°C, 5 dk
Denatürasyon--- 94°C, 1 dk
Primer yapışması--- 55°C, 1 dk
Uzama--- 72°C, 1 dk
Son uzama--- 72°C, 10 dk

} 30 döngü

CTX-M için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 10 dk
Denatürasyon--- 94 °C, 1 dk
Primer yapışması--- 60 °C, 1 dk
Uzama--- 72 °C, 1 dk
Son uzama--- 72 °C, 7 dk

} 30 döngü

5.5.2. AmpC Beta Laktamaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Beta laktam antibiyotiklere dirence yol açan AmpC genleri multipleks PZR reaksiyonu ile araştırılmıştır. Bu reaksiyonda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.4'te verilmiştir.

Tablo 5.4. AmpC beta laktamaz genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Enzim tipi	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	bç	Kaynak
MOX-1, MOX-2, CMY-1, CMY-8-11	MOXMF: GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT MOXMR: CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C	520 bç	
LAT1-4, CMY-2-7, BIL-1	CITMF: TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA CITMR: TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC	462 bç	
DHA-1, DHA-2	DHAME: AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T DHAMR: CCGTACGCATACTGGCTT TGC	405 bç	
ACC	ACCMF: AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA ACCMR: TTC GCC GCA ATC ATC CCT AGC	346 bç	
MIR-1T, ACT-1	EBCMF: TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG EBCMR: CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT	302 bç	
FOX-1-5b	FOXMF: AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G FOXMR: CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG	190 bç	

Not: Pérez-Pérez ve ark.'nın çalışmasından alınmıştır (60).

AmpC için multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 16,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 5 µl

dNTP karışımı--- 3 µl

Taq DNA polimeraz---0,3 µl

MOXMF primer (100 pmol)--- 1,5 µl

MOXMR primer (100 pmol)--- 1,5 µl

CITMF primer (100 pmol)---1,5 µl

CITMR primer (100 pmol)---1,5 µl

DHAME primer (100 pmol)--- 1,5 µl

DHAMR primer (100 pmol)--- 1,5 µl

ACCMF primer (100 pmol)--- 1,5 µl

ACCMR primer (100 pmol)--- 1,5 µl

EBCMF primer (100 pmol)--- 1,5 µl

EBCMR primer (100 pmol)--- 1,5 µl

FOXMF primer (100 pmol)--- 1,5 µl

FOXMR primer (100 pmol)--- 1,5 µl

DNA--- 2 µl

Toplam hacim--- 50 µl

AmpC için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 3 dk

Denatürasyon--- 94 °C, 30 sn

Primer yapışması--- 54 °C, 30 sn

Uzama--- 72 °C, 1 dk

Son uzama--- 72 °C, 7 dk

25 döngü

5.5.3. Karbapenemaz Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Karbapenemaz genleri üç ayrı multipleks PZR reaksiyonu ile araştırılmıştır. Reaksiyonlarda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.5’te verilmiştir.

Tablo 5.5. Karbapenemaz için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Enzim tipi	Oligonükleotit dizisi (5’-3’)	bç
OXA-48 benzeri	OXA-F: GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438 bç
	OXA-R: CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG	
KPC	KPC-F: CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG	798 bç
	KPC-R: CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG	
NDM	NDM-F: GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC	621 bç
	NDM-R: CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	
AIM	AIM-F: CTGAAGGTGTACGGAACAC	322 bç
	AIM-R: GTTCGGCCACCTCGAATTG	
DIM	DIM-F: GCTTGTCTTCGCTTGCTAACG	699 bç
	DIM-R: CGTTCGGCTGGATTGATTTG	
BIC	BIC-F: TATGCAGCTCCTTTAAGGGC	537 bç
	BIC-R: TCATTGGCGGTGCCGTACAC	
IMP	IMP-F: GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC	232 bç
	IMP-R: GGTTTAAYAAAACAACCACC	
SPM	SPM-F: AAAATCTGGGTACGCAAACG	271 bç
	SPM-R: ACATTATCCGCTGGAACAGG	
VIM	VIM-F: GATGGTGTTTGGTCGCATA	390 bç
	VIM-R: CGAATGCGCAGCACCAG	
GIM	GIM-F: TCGACACACCTTGGTCTGAA	477 bç
	GIM-R: AACTTCCAACCTTTGCCATGC	
SIM	SIM-F: TACAAGGGATTTCGGCATCG	570 bç
	SIM-R: TAATGGCCTGTTCCCATGTG	

Not: Poirel ve ark.’nın çalışmasından alınmıştır (123).

1.multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 31,7 µl
Taq tamponu--- 5 µl
MgCl₂--- 3 µl
dNTP karışımı--- 1 µl
Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl
OXA-F primer (10 pmol)--- 1 µl
OXA-R primer (10 pmol)--- 1 µl
NDM-F primer (10 pmol)--- 1 µl
NDM-R primer (10 pmol)--- 1 µl
KPC-F primer (10 pmol)--- 1 µl
KPC-R primer (10 pmol)--- 1 µl
BIC-F primer (10 pmol)--- 1 µl
BIC-R primer (10 pmol)--- 1 µl
DNA--- 1 µl
Toplam hacim--- 50 µl

2. multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 33,7 µl
Taq tamponu--- 5 µl
MgCl₂--- 3 µl
dNTP karışımı--- 1 µl
Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl
VIM-F primer (10 pmol)--- 1 µl
VIM-R primer (10 pmol)--- 1 µl
IMP-F primer (10 pmol)--- 1 µl
IMP-R primer (10 pmol)--- 1 µl
SPM-F primer (10 pmol)--- 1 µl
SPM-R primer (10 pmol)--- 1 µl
DNA--- 1 µl
Toplam hacim--- 50 µl

3. multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 31,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 3 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

AIM-F primer (10 pmol)--- 1 µl

AIM-R primer (10 pmol)--- 1 µl

GIM-F primer (10 pmol)--- 1 µl

GIM-R primer (10 pmol)--- 1 µl

SIM-F primer (10 pmol)--- 1 µl

SIM-R primer (10 pmol)--- 1 µl

DIM-F primer (10 pmol)--- 1 µl

DIM-R primer (10 pmol)---- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94°C, 10 dk

Denatürasyon--- 94°C, 30 sn

Primer yapışması--- 56°C, 40 sn

Uzama--- 72°C, 50 sn

Son uzama--- 72°C, 5 dk

} 36 döngü

5.5.4. Aminoglikozitlere Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Aminoglikozit direnci oluşturan ve plazmit ile aktarılan 16S rRNA metiltransferaz genleri polimeraz zincir reaksiyonları ile araştırılmıştır. Bu reaksiyonlarda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.6'da verilmiştir.

Tablo 5.6. 16S rRNA metiltransferaz genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Hedef gen	Oligonükleotid dizisi (5'-3')	bç
<i>armA</i>	armA-F: ATT CTG CCT ATC CTA ATT GG	315 bç
	armA-R: ACC TAT ACT TTA TCG TCG TC	
<i>rmtB</i>	rmtB-F: GCT TTC TGC GGG CGA TGT AA	173 bç
	rmtB-R: ATG CAA TGC CGC GCT CGT AT	
<i>rmtC</i>	rmtC-F: CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG	711 bç
	rmtC-R: ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT	
<i>rmtF</i>	F: ATT CAT CTG GGC TGC GTG CGA C	338 bç
	R: ACC AGC TCG TCC GAC ACC GTA A	

Not: Doi ve ark. ve Taylor ve ark. çalışmasından alınmıştır (124, 68).

armA, rmtB, rmtC için multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 33,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 3 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

armA-F primer (10 pmol)--- 1 µl

armA-R primer (10 pmol)--- 1 µl

rmtB-F primer (10 pmol)--- 1 µl

rmtB-R primer (10 pmol)--- 1 µl

rmtC-F primer (10 pmol)--- 1 µl

rmtC-R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

armA, rmtB, rmtC için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 96 °C, 5 dk

Denatürasyon--- 96 °C, 30 sn

Primer yapışması--- 55 °C, 30 sn

Uzama--- 72 °C, 1 dk

Son uzama--- 72 °C, 5 dk

30 döngü

rmtF için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 35,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 5 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

F primer (10 pmol)--- 1 µl

R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

rmtF için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 96°C, 5 dk

Denatürasyon--- 96°C, 30 sn

Primer yapışması--- 55°C, 30 sn

Uzama--- 72°C, 1 dk

Son uzama--- 72°C, 5 dk

30 döngü

5.5.5. Plazmit Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Kinolon grubu antibiyotiklerde dirence yol açan plazmit ilişkili kinolon direnç genleri (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrS*, *qepA*) varlığı araştırılmıştır. Bu reaksiyonlarda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.7’de verilmiştir.

Tablo 5.7. Plazmid aracılı kinolon direnç genleri için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Hedef gen	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	bç
<i>qnrA</i>	F: ATT TCT CAC GCC AGG ATT TG	468 bç
	R: TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC	
<i>qnrB</i>	F: CGA CCT KAG CGG CAC TGA AT	513 bç
	R: GAG CAA CGA YGC CTG GTA GYT G	
<i>qnrC</i>	F: GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC G	307 bç
	R: CAC CTA CCC ATT TAT TTT CA	
<i>qnrS</i>	F: ACT GCA AGT TCA TTG AAC AG	431 bç
	R: GAT CTA AAC CGT CGA GTT CG	
<i>qepA</i>	F: AAC TGC TTG AGC CCG TAG AT	596 bç
	R: GTC TAC GCC ATG GAC CTC AC	
	R: CTC GAA TGC CTG GCG TCT TT	

Not: Jacoby ve ark. ve Kim ve ark.'nın çalışmasından alınmıştır (125,126).

qnrA, qnrB ve qnrS için multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 17 µl

PCR Master Mix--- 25 µl

qnrA F primer--- 1 µl

qnrA R primer--- 1 µl

qnrB F primer--- 1 µl

qnrB R primer--- 1 µl

qnrS F primer--- 1 µl

qnrS R primer--- 1 µl

DNA--- 2 µl

Toplam hacim--- 50 µl

qnrA, qnrB, qnrS için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 95 °C, 10 dk

Denatürasyon--- 95 °C, 1 dk

Primer yapışması--- 54 °C, 1 dk

Uzama--- 72 °C, 1 dk

Son uzama--- 72 °C, 10 dk

35 döngü

gcpA için multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 35,7 µl
Taq tamponu--- 5 µl
MgCl₂--- 5 µl
dNTP karışımı--- 1 µl
Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl
F primer (10 pmol)--- 1 µl
R primer (10 pmol)--- 1 µl
DNA--- 1 µl
Toplam hacim--- 50 µl

gcpA için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 96 °C, 1 dk
Denatürasyon--- 96 °C, 1 dk
Primer yapışması--- 60 °C, 1 dk
Uzama--- 72 °C, 1 dk
Son uzama---72 °C, 5 dk

} 30 döngü

5.5.6. Taşınabilir Kolistin Direnç Genlerinin PZR Yöntemi ile Saptanması

Aktarılabılır kolistin direnç genlerinden en sık saptanan *mcr-1* ile dört direnç genine yönelik multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. Bu reaksiyonlarda kullanılan primerler ve ürünlerinin büyüklükleri Tablo 5.8’de verilmiştir.

Tablo 5.8. *mcr1-5* için kullanılan primer dizileri ve elde edilen ürünlerin büyüklükleri

Hedef gen	Oligonükleotit dizisi (5’-3’)	bç
<i>mcr-1</i>	Multi <i>mcr-1</i> -/2-Fw: TAT CGC TAT GTG CTA AAG CCT G	1139 bç
	Multi <i>mcr-1</i> Rv: CGT CTG CAG CCA CTG G	
<i>mcr-2</i>	Multi <i>mcr-1</i> -/2-Fw : TAT CGC TAT GTG CTA AAG CCT G	816 bç
	Multi <i>mcr-2</i> Rv: AAA ATA CTG CGT GGC AGG TAG C	
<i>mcr-3</i>	Multi <i>mcr-3</i> Fw: CAA TCG TTA GTT ACA CAA TGA TGA AG	676 bç
	Multi <i>mcr-3</i> Rv: AAC ACA TCT AGC AGG CCC TC	
<i>mcr-4</i>	Multi <i>mcr-4</i> Fw: ATC CTG CTG AAG CAT TGA TG	405 bç
	Multi <i>mcr-4</i> Rv: GCG CGC AGT TTC ACC	
<i>mcr-5</i>	Multi <i>mcr-5</i> Fw: GGT TGA GCG GCT ATG AAC	207 bç
	Multi <i>mcr-5</i> Rv: GAA TGT TGA CGT CAC TAC GG	

Not: Jousset ve ark.’nın çalışmasından alınmıştır (127).

mcr1-5 için multipleks PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 3 µl
PCR Master Mix--- 25 µl
Multi mcr-1-/2-Fw primer (10 pmol)--- 4 µl
Multi mcr-1Rv primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-2Rv primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-3Fw primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-3Rv primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-4Fw primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-4Rv primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-5Fw primer (10 pmol)--- 2 µl
Multi mcr-5Rv primer (10 pmol)--- 2 µl
DNA--- 2 µl
Toplam hacim--- 50 µl

mcr1-5 için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 5 dk
Denatürasyon--- 94 °C, 30 sn
Primer yapışması--- 56 °C, 1 dk
Uzama--- 72 °C, 1 dk
Son uzama--- 72 °C, 5dk

} 25 döngü

5.5.7. Agaroz Jel Hazırlanması ve PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektrofrezinde Saptanması

Yapılan her PZR sonrası, çalışılan gen bölgesinin varlığının belirlenmesi için agaroz jel elektroforezi yapılmıştır. Jel hazırlanmasında, moleküler grade agaroz (Axygen, Almanya) ile, 0,5x TBE (tris-borat-EDTA)(Biotek, Türkiye) kullanılarak hacim tamamlanmış ve %1 konsantrasyonunda çözelti hazırlanmıştır. Bu çözelti mikrodalga fırında agaroz tamamen eriyinceye kadar ısıtılmıştır. Çözelti soğutulduktan sonra üzerine %1 etidyum bromid (AppliChem, ABD) solüsyonundan 0,5 mikrolitre ilave edilmiştir. Uygun tarak yerleştirilen jel tabağına dökülmüş ve donması beklenmiştir. Jel, jel tabağıyla birlikte elektroforez tankına (Thermo Scientific, ABD) yerleştirilmiştir ve tanka 0,5x TBE doldurulmuştur. Tarak çıkarıldıktan sonra 7 µL PZR ürünü, 3 µL yükleme tamponuyla (Sigma-Aldrich, Almanya)

kariştirilip kuyucuklara yüklenmiştir. 100 V elektrik akımında 1 saat yürütölmüş ve UV transilluminatör (VilberLourmat, Fransa) ile 312 nm’de elde edilen bantlar değeriendirilmiş ve fotoğraflanmıştır (Canon PowerShot G5, Kanada). Ürünlerin büyüklüklerinin değeriendirilebilmesi için 100 bp DNA büyüklük belirteci (Bioron, Almanya; GeneRuler, ABD) kullanılmıştır.

5.6. mgrB Kromozomal Gen Mutasyonunun Saptanması

K.pneumoniae’de kromozomal kolistin direnci oluşumundan en sık sorumlu olan *mgrB* genindeki mutasyonların araştırılması için, sıvı mikrodilüsyon ile dirençli bulunan izolatlarda gen bölgesi PZR ile çoğaltılmıştır (Tablo 5.9). PZR reaksiyonu, ısı döngü cihazı (TC412, Techne, Birleşik Krallık) kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tablo 5.9. *mgrB* gen bölgesini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Hedef gen	Oligonükleotit dizisi (5’-3’)
<i>mgrB</i>	<i>mgrB_ext_F</i> : AAG GCG TTC ATT CTA CCA CC
	<i>mgrB_ext_R</i> : TTA AGA AGG CCG TGC TAT CC

Not: Cannatelli ve ark.’nın çalışmasından alınmıştır (81).

mgrB için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O----- 37,7 µl
Taq Buffer----- 5 µl
MgCl₂-----3 µl
dNTP mix----- 1 µl
Taq Polimeraz----- 0,3 µl
mgrB_ext_F primer (10 pmol)-- 1 µl
mgrB_ext_R primer (10 pmol)-- 1 µl
DNA----- 1 µl
Total volüm----- 50 µl

mgrB için PZR programı, 30 döngü

Başlangıç denatürasyonu----- 95 °C, 3 dk
Denatürasyon----- 95 °C, 30 sn
Primer yapışması (annealing)---- 54 °C, 30 sn

Sentez (uzama)----- 72 °C, 1 dk 45 sn

Son uzama----- 72 °C, 5 dk

%1 konsantrasyonunda agaroz jel hazırlanmış ve jel elektroforezi yapılarak PZR ürünlerinin doğruluğu kontrol edilmiştir. Ürünler, ExoSap (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak saflaştırılmış, BigDye 3.1 floresan işaretli ddNTPler (Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek PZR gerçekleştirilmiş, Seqstudio (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında dizi analizi yapılmıştır. Analiz sonuçları Snapgene software programı ile görüntülenmiştir. Elde edilen nükleik asit dizileri ile karşılık gelen aminoasit dizileri kolistin duyarlı *K. pneumoniae* NH53 suşuna (erişim no: KF852760) ait vahşi tip *mgrB* dizisi ve protein ürünü BLAST® veri tabanı kullanılarak karşılaştırılmıştır (128, 129).

5.7. Kapsüler polisakkarit tiplerinin belirlenmesi

Kapsüler polisakkarit tiplerinin belirlenmesi için *wzi* geni polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak çoğaltılmıştır. Hedef bölgeler, kullanılacak primer dizileri, baz çifti boyutları Tablo 5.10'da verilmiştir. PZR reaksiyonu ısı döngü cihazı (TC412, Techne, Birleşik Krallık) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ürünler, ExoSap (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak saflaştırılmış, BigDye 3.1 floresan işaretli ddNTPler (Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek PZR gerçekleştirilmiş, Seqstudio (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında dizi analizi yapılmıştır. Gen dizileri Snapgene software programı ile görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir. FASTA formatındaki baz dizileri, BIGSdb-Pasteur *Klebsiella pneumoniae* allel ve profil veri tabanında aranarak eşleşen alleller bulunmuştur (130).

Tablo 5.10. *wzi* gen bölgesini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Hedef gen	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	bç
<i>wzi</i>	<i>wzi_for2</i> : GTG CCG CGA GCG CTT TCT ATC TTG GTA TTC C	580 bç
	<i>wzi_rev</i> : GAG AGC CAC TGG TTC CAG AAC/T TTC/G ACC GC	

Not: Brisse ve ark.'nın çalışmasından alınmıştır (104).

wzi geni için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 37,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 3 µl

dNTP karışımı--- 1 µl
Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl
wzi_for2 (10 pmol)--- 1 µl
wzi_rev (10 pmol)--- 1 µl
DNA--- 1 µl
Toplam hacim--- 50 µl

wzi geni için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 2 dk
Denatürasyon--- 94 °C, 30 sn
Primer yapışması--- 55 °C, 40 sn
Uzama--- 72 °C, 30 sn
Son uzama--- 72 °C, 5 dk

} 30 döngü

5.8. Pulsed Field Gel Elektroforezi (Pulsed Field Gel Electrophoresis-PFGE)

İzolatlar arasındaki moleküler epidemiyolojik benzerlik ve farklılıkları ortaya koymak, izolatların ve sahip oldukları direnç genlerinin klonal dağılımını belirlemek için PFGE kullanılmıştır (131, 132).

5.8.1. PFGE Yönteminde Kullanılacak İzolatların Hazırlanması

Bakteri izolatları, KKA (Becton Dickinson, ABD) besiyerine ekilmiş ve 37°C’de 18 saat aerobik koşullarda inkübe edilmiştir. Üreyen kolonilerden birer öze dolusu (0.1 µl’lik öze) alınıp, 3 ml beyin kalp infüzyon buyyonu (Biolife, İtalya) içerisine koyulmuş ve 18 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonu takiben etüvden çıkarılan beyin kalp infüzyon buyyonlarına 13,000 g’de 5 dk santrifügasyon işlemi uygulandıktan sonra süpernatant atılmıştır. Elde edilen pellet üzerine 500 µl TE tamponu (10mM Tris, 1mM EDTA, pH:7,5) eklenmiş, 5 sn vorteks (HVD, Avusturya) uygulanmış ve nanofotometrede (Implen, Almanya) optik dansiteleri 0.9–1.1 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu süspansiyondan 400 µl alınıp mikrosantrifüj tüplerine konulmuş ve 50000 g’de 3 dakika santrifügasyon (Eppendorf, Almanya) işlemi uygulanmıştır. Santrifügasyon işleminden sonra süpernatant uzaklaştırılmış ve pelletin üzerine 150 µl TE tamponu ve 20 µl proteinaz K (20 mg/mL, Sigma-Aldrich, Almanya) koyulmuştur.

5.8.2. İzolatların Agaroza Gömülmesi

Düşük erime sıcaklığına sahip agarozun (low melt, LMP (Bio Basic, Kanada) 0,375 gr'ı, 25 mL TE ile mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) birkaç defa kaynamasına izin verilerek iyice eritilmiştir. 55°C'lik su banyosuna konularak donması engellenmiş, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu ile %1,5 LMP agaroz eşit oranlarda (her ikisinden de 100'er µl) pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Bu karışımdan pipet yardımıyla 100 µl alınıp agaroz kalıbının kuyucuklarına dağıtılmış, kalıplar +4°C'de 10 dakika bekletilerek agarozun katılaşması sağlanmıştır.

5.8.3. Agar İçerisindeki Hücrelerin Parçalanması

Hazırlanan kalıplar öze yardımıyla jel tutucudan çıkartılmış, 5 mL lizis tamponu (50mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + %1 Sarcosyl) içeren tüplerin içine konulmuş ve 20 µl proteinaz K eklenmiştir. Tüpler çalkalayıcı su banyosuna (GFL, Almanya) yerleştirilmiş ve bir gece 56°C'de inkübe edilmiştir.

5.8.4. Agaroz Kalıpların Yıkanması

Tüplerin içerisindeki tampon dökülüp, 5-10 ml TE tamponu ile 5 kez 30 dakika boyunca çalkalayıcıda (HVD, Avusturya) yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Kesim enzimi ile karşılaştırılınca kadar 4 ml TE içinde +4°C'de saklanmıştır.

5.8.5. DNA'nın Kesim Enzimiyle Kesilmesi

Kesim işlemi için kalıplar TE içeren tampondan çıkarılıp üçte biri kalınlığında kesilmiş, 180 µl distile su içeren mikrosantrifüj tüplerine konulmuş ve üzerine 20 µl Tango tamponu (Thermo Scientific, ABD) eklenmiştir. Yarım saat boyunca 37°C kuru blokta bekletilmiştir. Tampon su karışımı da uzaklaştırılmış ve mikrosantrifüj tüplerine enzim-tampon karışımı (3 µl XBaI (Thermo Scientific, ABD) (10 U/µL)+180 µl distile su + 17 µl Tango tamponu) konularak, 30°C'de ısıtıcı blokta (HVD, Avusturya) 4 saat bekletilmiştir. Sürenin sonunda tampon-su-enzim karışımı uzaklaştırılmış ve 1000 µl 0,5x TBE tamponu eklenmiştir.

5.8.6. Elektroforez Jelinin Hazırlanması

Tarağın dişlerinin uç kısımlarına bir tanesi boş bırakılarak TBE tampondan çıkarılan agaroz kalıpları yerleştirilmiştir. Tarak oda sıcaklığında tutularak agaroz kalıpların tarağın ucuna yapışması beklenildikten sonra jel, dökülecek kasete yerleştirilmiştir. Bu sırada, 1 gr “pulsed-field certified” agaroz (Bio-Rad, ABD) ve 100 mL 0,5x TBE kullanılarak %1’lik jel hazırlanmıştır. 45-50°C sıcaklığında olan agaroz kasete dökülmüştür. Katılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletilmiştir. Lambda Ladder PFGE Marker (New England Biolabs, İngiltere) belirteç olarak kullanılmıştır. Kalan boşluklar ayrılan 3-5 ml jel ile pipet yardımıyla agaroz ile doldurulmuştur. Tanka 1700 ml 0.5x TBE tamponu koyulmuştur. Tabla ve üzerindeki agaroz jel PFGE tankına yerleştirilmiştir.

5.8.7. Elektroforez Sistemi

PFGE için CHEFF-DR II cihazında (Bio-Rad Laboratories, Nazareth, Belgium) elektroforez uygulanmıştır. Elektroforez şartları aşağıda belirtildiği gibidir:

Başlangıç vuruş süresi: 2,2 sn

Bitiş vuruş süresi: 63,8 sn

Akım: 6 V/cm²

Sıcaklık: 14°C

Süre: 18 saat

5.8.8. Jelin Boyanması

Elektroforez sonrasında jel, 30 µl %1 etidyum bromid (AppliChem, ABD) içeren 300 ml ultra saf su ile çalkalayıcıda 30 dakika boyanmıştır. Sonrasında jel 300 ml ultra saf su içerisinde 45 dakika 2–3 kere suyu değiştirilerek çalkalayıcıda yıkanmış, böylece DNA’ya bağlanmamış boya uzaklaştırılmıştır. UV Transillüminatör (Vilber-Lourmat TFX–20.M (ETX–20 M), Fransa) altında bantların fotoğrafı (Canon Power Shot G5, Kanada) çekilmiş ve kayıt edilmiştir.

5.8.9. Sonuçların Değerlendirilmesi

PFGE sonrasında oluşan DNA paternleri “Gel Compar II (Applied Maths, Belçika) programı ile değerlendirilmiştir. Benzerlik indeksi “Dice” katsayısı kullanılarak %0,5 tolerans, %1 optimizasyon değerinde oluşturulmuş ve izolatlar arası kümelenme ilişkisi aritmetik

ortalomalı ağırlıksız çift grup yöntemi (unweighted pair group method of arithmetic averages-UPGMA) yöntemi kullanılarak gösterilmiştir. Bu istatistiksel analizde % 90-100 uyum gösteren izolatlar aynı; % 80-90 arası uyum gösterenler yakın ilişkili; % 70-80 arası uyum gösterenler muhtemel ilişkili olarak değerlendirilmiştir. % 70'in altı ise ilişkisiz kabul edilmiştir.

5.9. Multilokus Sekans Tiplendirme

İzolatların MLST tiplerinin belirlenmesi için, yedi 'housekeeping' gen (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpoB*, *tonB*) spesifik primerlerle Diancourt ve ark. tarafından tanımlanan şekilde PZR ile çoğaltılmıştır (113). Hedef bölgeler, kullanılacak primer dizileri, baz çifti boyutları Tablo 5.11'de verilmiştir. PZR reaksiyonu ısı döngü cihazı (TC412, Techne, Birleşik Krallık ve Primus 25 Thermal Cycler, MWG Biotech Inc, ABD) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PZR ürünleri saflaştırılmış ve dizi analizi yapılmıştır. Ürünler, ExoSap (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak saflaştırılmış, BigDye 3.1 floresan işaretli ddNTPler (Thermo Fisher Scientific, ABD) eklenerek PZR gerçekleştirilmiş, Seqstudio (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında dizi analizi yapılmıştır. Gen dizileri Snapgene viewer programı ile görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir. FASTA formatındaki baz dizileri, BIGSdb-Pasteur *Klebsiella pneumoniae* allel ve profil veri tabanında aranarak eşleşen alleller bulunmuştur ve bu allelik profillere karşılık gelen dizi tipleri de aynı veri tabanında ortaya konmuştur (130).

Tablo 5.11. 'Housekeeping' gen bölgelerini çoğaltmaya yönelik polimeraz zincir reaksiyonunda kullanılan primerler

Hedef gen	Oligonükleotit dizisi (5'-3')	bç
<i>rpoB</i>	VIC3: GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA	501 bç
	VIC2: GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC	
<i>gapA</i>	gapA173: TGA AAT ATG ACT CCA CTC ACG G	450 bç
	gapA181: CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT	
<i>mdh</i>	mdh130: CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG	477 bç
	mdh867: CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG	
<i>pgi</i>	pgi2F: CTG CTG GCG CTG ATC GGC AT	432 bç
	pgi2R: TTA TAG CGG TTA ATC AGG CCG T	
<i>phoE</i>	phoE604.1: ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG	420 bç
	phoE604.2: TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT	
<i>infB</i>	infB2F: ACT AAG GTT GCC TCC GGC GAA GC	318 bç
	infB1R: CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC	
<i>tonB</i>	tonB1F: CTT TAT ACC TCG GTA CAT CAG GTT	414 bç
	tonB2R: ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG	

Not: Diancourt ve ark.'nın çalışmasından alınmıştır (113).

'Housekeeping' genler için PZR reaksiyon karışımı

dH₂O--- 37,7 µl

Taq tamponu--- 5 µl

MgCl₂--- 3 µl

dNTP karışımı--- 1 µl

Taq DNA polimeraz--- 0,3 µl

F primer (10 pmol)--- 1 µl

R primer (10 pmol)--- 1 µl

DNA--- 1 µl

Toplam hacim--- 50 µl

rpoB, mdh, pqi, phoE, infB için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 2 dk

Denatürasyon--- 94 °C, 20 sn

Primer yapışması--- 50°C, 30 sn

Uzama--- 72 °C, 30 sn

Son uzama--- 72 °C, 5 dk

35 döngü

gapA için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 2 dk

Denatürasyon--- 94 °C, 20 sn

Primer yapışması--- 60 °C, 30 sn

Uzama--- 72 °C, 30 sn

Son uzama--- 72 °C, 5 dk

35 döngü

tonB için PZR programı

Başlangıç denatürasyonu--- 94 °C, 2 dk

Denatürasyon--- 94 °C, 20 sn

Primer yapışması--- 48 °C, 30 sn

Uzama--- 72 °C, 30 sn

Son uzama--- 72 °C, 5 dk

35 döngü

6. BULGULAR

6.1. İzolatların Genel Özellikleri

Çalışmaya; 6'sı yenidoğan, 28'i çocuk yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların kültürlerinden bir yıllık sürede izole edilmiş toplam 36 karbapenem dirençli *Klebsiella* izolatı dahil edilmiş, bakterilerin tamamı MALDI-TOF MS ile *K. pneumoniae* olarak tanımlanmıştır.

Çalışmada; yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan 3'ü (%50,0) kız, 3'ü (%50,0) erkek 6 hastadan 6 izolat; çocuk yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan 15'i (%53,57) kız, 13(%46,43)'ü erkek 28 hastadan 30 izolat toplanmıştır. Hastaların birden fazla kültür örneğinde aynı izolat ürediyse yalnızca elde edilen ilk örnek çalışmaya dahil edilmiştir. İki hastadan ilk izolatlarına göre fenotipik olarak farklı antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına sahip birer izolat daha çalışmaya eklenmiştir. Yenidoğan yoğun bakım ve çocuk yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların yaşları sırasıyla 2 gün ile 1 ay 21 gün ve 1 ay 5 gün ile 16 yıl 9 ay arasında değişmektedir.

İzolatlar; trakeal aspirat (TA), kan, idrar, kateter ucu, bronkoalveoler lavaj (BAL), dren sıvısı ve yara sürüntüsü örneğinden elde edilmiştir (Tablo 6.1).

Tablo 6.1. *K. pneumoniae* izolatlarının elde edildiği örneklerin dağılımı

İzolasyon Yeri	Örnek Sayısı	Örnek Sayısı (%)
Trakeal aspirat (TA)	13	36,11
Kan	12	33,33
İdrar	5	13,89
Kateter	3	8,33
Bronkoalveoler lavaj (BAL)	1	2,78
Dren sıvısı	1	2,78
Yara sürüntüsü	1	2,78

Çalışmaya alınan *K. pneumoniae* izolatlarının epidemiyolojik özellikleri Tablo 6.2'de görülmektedir.

Tablo 6.2. *K. pneumoniae* suşlarının epidemiyolojik özellikleri

Hasta	Suş	Tarih	Örnek	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ETP	IMP	MEM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	KOL	GSBL	AmpC	KPaz	PAKD	RMT	PFGE	ST
1	Ç1	18.10.2020	TA	R	R	S	R	R	R	=0,25 S	=2 S	=0,5 S	=0,25 S	=0,25 S	=0,125 S	=0,25 S	=0,5 S	=2 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	E	985
2	Ç2	24.10.2020	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=32 R	=1 S	=32 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	D	147
3	Ç3	23.10.2020	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=4 S	=64 R	=32 R	>32 R	=2 R	=16 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	F	37
4	Ç4	5.11.2020	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=4 S	>256 R	=128 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	D	147
3	Ç5	10.11.2020	Yara	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	=128 R	>32 R	>32 R	=64 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	armA	B	2096
5	Ç6	14.11.2020	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=0,5 S	=1 S	=1 S	=0,25 S	=0,25 S	=2 S	SHV	-	NDM	qnrS	-	G	-
6	Ç7	24.12.2020	Kan	R	R	R	R	R	R	=16 R	=2 S	=4 I	=8 S	>256 R	>256 R	>32 R	=16 R	=4 R	SHV, CTX-M	-	-	qnrB	-	E	985
7	Ç8	1.02.2021	TA	R	R	S	R	R	R	=0,5 S	=1 S	=0,5 S	=8 S	>256 R	>256 R	=16 R	=8 R	=1 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	H	152
1	Ç9	7.02.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	=8 R	=16 R	=32 R	>256 R	=32 R	>32 R	=16 R	=16 R	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	I	-
8	Ç10	3.03.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=64 R	=2 S	=128 R	=0,032 S	=0,064 S	=32 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	J	661
9	Ç11	8.04.2021	İdrar	R	R	S	R	R	R	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=128 R	=4 R	=0,5 S	=1 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
10	Ç12	16.04.2021	TA	R	R	S	R	R	R	=0,5 S	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=128 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	A	14
11	Ç13	29.04.2021	Dren	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	=8 R	=32 R	=32 R	=16 R	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	K	101
12	Ç14	5.05.2021	BAL	R	R	S	R	R	R	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
13	Ç15	7.05.2021	TA	R	R	S	R	R	R	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
14	Ç16	15.05.2021	Kan	R	R	S	R	R	R	=1 R	=2 S	=1 S	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=4 R	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14

Tablo 6.2. *K. pneumoniae* suşlarının epidemiyolojik özellikleri (devamı)

Hasta	Suş	Tarih	Örnek	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ETP	IMP	MEM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	KOL	GSBL	AmpC	KPaz	PAKD	RMT	PFGE	ST
15	Ç17	18.05.2021	Kan	R	R	S	R	R	R	=0,5 S	=1 S	=0,25 S	=32 R	>256 R	=256 R	=0,125 S	=0,125 S	=32 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	L	17
16	Ç18	31.05.2021	TA	R	R	R	R	R	R	=4 R	=2 S	=0,5 S	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=4 R	=1 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
17	Ç19	1.06.2021	Kateter	R	R	S	R	R	R	=2 R	=1 S	=1 S	=2 S	=128 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=1 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
18	Ç20	14.06.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	=8 R	=32 R	=2 S	=4 S	>256 R	=128 R	=0,125 S	=0,064 S	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	A	14
19	Ç21	17.06.2021	TA	R	R	S	R	R	R	=1 R	=4 I	=4 I	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=16 R	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
20	Ç22	18.06.2021	İdrar	R	R	R	R	R	R	=2 R	=4 I	=0,5 S	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=16 R	=2 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
21	Ç23	19.06.2021	Kan	R	R	S	R	R	R	>32 R	=2 S	=4 I	=2 S	>256 R	=128 R	>32 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
22	Ç24	26.07.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=2 S	=0,5 S	=32 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV	-	OXA-48 benzeri	-	-	M	14
23	Ç25	6.08.2021	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	armA	B	2096
24	Y1	21.08.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
25	Ç26	2.09.2021	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	armA	B	2096
26	Ç27	4.09.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	=2 S	=2 S	>256 R	=128 R	=2 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
27	Y2	4.09.2021	İdrar	R	R	R	R	R	R	=4 R	>32 R	=1 S	=4 S	>256 R	=64 R	=0,25 S	=0,125 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	-	A	14

Tablo 6.2. *K. pneumoniae* suşlarının epidemiyolojik özellikleri (devamı)

Hasta	Suş	Tarih	Örnek	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ETP	IMP	MEM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	KOL	GSBL	AmpC	KPaz	PAKD	RMT	PFGE	ST
28	Y3	5.09.2021	İdrar	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	=4 I	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=2 R	=1 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
29	Y4	16.09.2021	İdrar	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=1 S	=0,5 S	=1 S	=2 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
30	Ç28	22.09.2021	TA	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	=8 R	=0,5 S	SHV	CIT	OXA-48 benzeri	qnrB, qnrS	rmtC	C	661
31	Y5	9.10.2021	Kateter	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	=1 S	=1 S	=0,5 S	>32 R	>32 R	=1 S	SHV	-	KPC	qnrB	-	N	307
32	Y6	11.10.2021	Kan	R	R	R	R	R	R	=16 R	=32 R	=2 S	=2 S	>256 R	=32 R	=16 R	=2 R	=2 S	SHV, CTX-M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A	14
33	Ç29	15.10.2021	Kateter	R	R	R	R	R	R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	=8 R	=1 S	SHV	CIT	OXA-48 benzeri	qnrB, qnrS	rmtC	C	661
34	Ç30	15.12.2021	TA	R	R	S	R	R	R	=0,5 S	=2 S	=0,064 S	=2 S	=0,5 S	=16 R	=0,064 S	=0,064 S	=2 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	-	O	39

Ç: çocuk, Y: yenidoğan, TA: trakeal aspirat, BAL: bronkoalveoler lavaj, AMC: amoksisilin klavulonat, PTZ: piperasilin tazobaktam, FOX: sefoksitin, CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, FEP: sefepim, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, AK: amikasin, GN: gentamisin, TOB: tobramisin, KOL: kolistin, S: duyarlı, I: artmış dozda duyarlı, R: dirençli, GSBL: genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, AmpC: AmpC beta-laktamaz, KPaz: karbapenemaz, PAKD: plazmid aracılı kinolon direnci genleri, RMT: 16S rRNA metiltransferaz, PFGE: pulsed field jel elektroforezi, ST: sekans tipi

6.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testlerinin Sonuçları

6.2.1. Disk Difüzyon Yönteminin Sonuçları

K.pneumoniae suşlarının disk difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çapları EUCAST 2022 kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Amoksisilin klavulanat, piperasilin tazobaktam, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim ve sefepim duyarlılığı belirlenmiştir.

İzolatların tamamı, amoksisilin klavulanat, piperasilin tazobaktam, sefotaksim, seftazidim ve sefepime dirençliken, 12'si (%33,33) sefoksitine duyarlı bulunmuştur (Tablo 6.3).

Tablo 6.3. Disk difüzyon yöntemi sonuçları

Örnek no	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	Örnek no	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP
Ç1	R	R	S	R	R	R	Ç19	R	R	S	R	R	R
Ç2	R	R	R	R	R	R	Ç20	R	R	R	R	R	R
Ç3	R	R	R	R	R	R	Ç21	R	R	S	R	R	R
Ç4	R	R	R	R	R	R	Ç22	R	R	R	R	R	R
Ç5	R	R	R	R	R	R	Ç23	R	R	S	R	R	R
Ç6	R	R	R	R	R	R	Ç24	R	R	R	R	R	R
Ç7	R	R	R	R	R	R	Ç25	R	R	R	R	R	R
Ç8	R	R	S	R	R	R	Ç26	R	R	R	R	R	R
Ç9	R	R	R	R	R	R	Ç27	R	R	R	R	R	R
Ç10	R	R	R	R	R	R	Ç28	R	R	R	R	R	R
Ç11	R	R	S	R	R	R	Ç29	R	R	R	R	R	R
Ç12	R	R	S	R	R	R	Ç30	R	R	S	R	R	R
Ç13	R	R	R	R	R	R	Y1	R	R	R	R	R	R
Ç14	R	R	S	R	R	R	Y2	R	R	R	R	R	R
Ç15	R	R	S	R	R	R	Y3	R	R	R	R	R	R
Ç16	R	R	S	R	R	R	Y4	R	R	R	R	R	R
Ç17	R	R	S	R	R	R	Y5	R	R	R	R	R	R
Ç18	R	R	R	R	R	R	Y6	R	R	R	R	R	R

AMC: amoksisilin klavulanat, PTZ: piperasilin tazobaktam, FOX: sefoksitin, CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, FEP: sefepim, S: duyarlı, R: dirençli

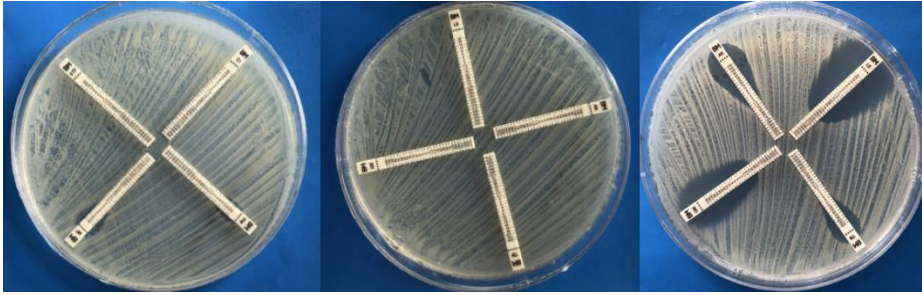
6.2.2. Gradyent Şerit Test Yönteminin Sonuçları

K. pneumoniae izolatların; ertapenem, imipenem, meropenem, amikasin, gentamisin, tobramisin, siprofloksasin ve levofloksasin MİK değerleri EUCAST 2022 kriterlerine göre değerlendirilmiş, buna göre duyarlı bulunanlar yeşil; artmış dozda duyarlı bulunan izolatlar sarı; dirençli bulunan izolatlar kırmızı renk ile Tablo 6.4'te gösterilmiştir. Örnek gradient şerit testi fotoğrafı Şekil 6.1'dedir.

Karbapenem grubu antibiyotiklerden ertapeneme beş (%13,89), imipeneme 13 (%36,11), meropeneme 16 (%44,44) duyarlı (S) izolat saptanırken; ertapeneme 31 (%86,11), imipeneme 21 (%58,33), meropeneme 16 (%44,44) dirençli (R) izolat saptanmıştır. İmipenem için iki (%5,56), meropenem için ise dört (%11,11) izolat artmış dozda duyarlı kategorisinde (I) yer almaktadır. On altı (%44,44) izolat her üç karbapeneme de dirençli saptanmıştır.

Aminoglikozit grubu antimikrobiyallerden 26 (%72,22) izolat amikasinine duyarlıyken, 10 (%27,78) izolatın dirençli olduğu belirlenmiştir. Gentamisine sekiz (%22,22) duyarlı izolat, 28 (%77,78) dirençli izolat saptanırken; tobramisine duyarlı beş (%13,89) izolat, 31 (%86,11) dirençli izolat saptanmıştır.

Florokinolon grubu antimikrobiyallerden siprofloksasin için duyarlı yedi (%19,44) izolat, 29 dirençli (%80,56) izolat; levofloksasin için duyarlı 14 (%38,89) izolat, 3 artmış dozda duyarlı (%8,33) izolat, 19 dirençli (%52,78) izolat saptanmıştır.



Şekil 6.1. Gradyent şerit test yöntemi

6.2.3. Sıvı Mikrodilüsyon Yönteminin Sonuçları

Sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile 11 (%30,56) izolat kolistine dirençli saptanmıştır. İzolatların MİK değerlerinin dağılımı Tablo 6.4'te verilmiştir.

Tablo 6.4. Gradyent şerit test ve sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen MİK sonuçları

Örnek no	ETP (µg/mL)	IMP (µg/mL)	MEM (µg/mL)	AK (µg/mL)	GN (µg/mL)	TOB (µg/mL)	CIP (µg/mL)	LEV (µg/mL)	KOL (µg/mL)
Ç1	= 0,25	= 2	= 0,5	= 0,25	= 0,25	= 0,125	= 0,25	= 0,5	=2
Ç2	>32	>32	>32	= 32	= 1	= 32	>32	>32	=8
Ç3	>32	>32	>32	= 4	= 64	= 32	>32	= 2	=16
Ç4	>32	>32	>32	= 4	>256	= 128	>32	>32	=8
Ç5	>32	>32	>32	>256	>256	= 128	>32	>32	=64
Ç6	>32	>32	>32	= 0,5	= 1	= 1	= 0,25	= 0,25	=2
Ç7	= 16	= 2	= 4	= 8	>256	>256	>32	= 16	=4
Ç8	= 0,5	= 1	= 0,5	= 8	>256	>256	= 16	= 8	=1
Ç9	>32	=8	=16	= 32	>256	= 32	>32	= 16	=16
Ç10	>32	>32	>32	= 64	= 2	= 128	= 0,032	= 0,064	=32
Ç11	= 1	= 2	= 0,25	= 4	>256	= 128	= 4	= 0,5	=1
Ç12	= 0,5	= 2	= 0,25	= 4	>256	= 128	= 4	= 0,5	=0,5
Ç13	>32	>32	>32	>256	>256	= 8	= 32	= 32	=16
Ç14	= 1	= 2	= 0,25	= 4	>256	= 64	= 4	= 0,5	=0,5
Ç15	= 1	= 2	= 0,25	= 4	>256	= 64	= 4	= 0,5	=0,5
Ç16	= 1	= 2	= 1	= 2	>256	= 64	>32	= 4	=0,5
Ç17	= 0,5	= 1	= 0,25	= 32	>256	= 256	= 0,125	= 0,125	=32
Ç18	= 4	= 2	= 0,5	= 2	>256	= 64	>32	= 4	=1
Ç19	= 2	= 1	= 1	= 2	= 128	= 64	= 4	= 0,5	=1
Ç20	= 8	= 32	= 2	= 4	>256	= 128	= 0,125	= 0,064	=0,5
Ç21	= 1	= 4	= 4	= 8	>256	= 128	>32	= 16	=0,5
Ç22	= 2	= 4	= 0,5	= 8	>256	= 128	>32	= 16	=2
Ç23	>32	= 2	= 4	= 2	>256	= 128	>32	= 1	=0,5
Ç24	>32	>32	>32	= 2	= 0,5	= 32	>32	>32	=8
Ç25	>32	>32	>32	>256	>256	>256	>32	>32	=8
Ç26	>32	>32	>32	>256	>256	>256	>32	>32	=0,5
Ç27	>32	>32	= 2	= 2	>256	= 128	= 2	= 0,5	=0,5
Ç28	>32	>32	>32	>256	>256	>256	>32	= 8	=0,5
Ç29	>32	>32	>32	>256	>256	>256	>32	= 8	=1
Ç30	= 0,5	= 2	= 0,064	= 2	= 0,5	= 16	= 0,064	= 0,064	=2
Y1	>32	>32	>32	= 8	>256	= 128	>32	= 1	=0,5
Y2	= 4	>32	= 1	= 4	>256	= 64	= 0,25	= 0,125	=0,5
Y3	>32	>32	= 4	= 2	>256	= 64	>32	= 2	=1
Y4	>32	>32	>32	= 1	= 0,5	= 1	= 2	= 1	=0,5
Y5	>32	>32	>32	= 1	= 1	= 0,5	>32	>32	=1
Y6	= 16	= 32	= 2	= 2	>256	= 32	= 16	= 2	=2

Ç: çocuk, Y: yenidoğan, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, AK: amikasin, GN: gentamisin, TOB: tobramisin, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, KOL: kolistin

6.3. Karbapenemaz Üretimi Tarama Sonuçları

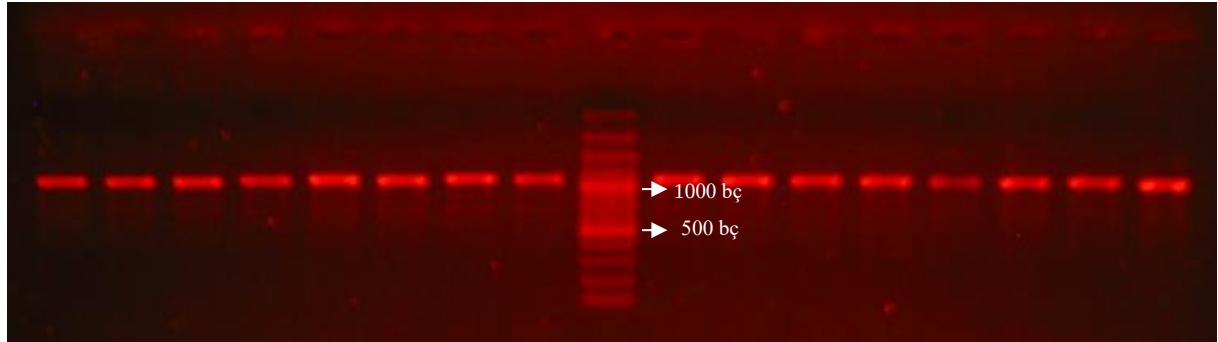
K. pneumoniae izolatlarının karbapenemaz üretiminin fenotipik olarak değerlendirmesinde karbapenem inaktivasyon yöntemi (CIM) kullanılmış, 16–20 saatlik inkübasyon sonunda zon çapları değerlendirilmiştir. İzolatların 34'ünde (%94,44) meropenem diskinin çevresinde zon oluşumu gözlenmemiştir dolayısıyla, bu izolatların karbapenemaz üretimi pozitif olarak belirlenmiştir. Ç6 ve Ç7 numaralı izolatlarda ise disk çevresinde 25 mm zon çapı ölçülmüş, bu iki izolatın karbapenemaz üretimi negatif olarak değerlendirilmiştir.

6.4. Antimikrobiyal Direnç Genlerini Saptamaya Yönelik PZR Sonuçları

6.4.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz PZR Sonuçları

SHV, CTX-M ve TEM beta-laktamazlara yönelik yapılan PZR'ye göre; tüm izolatlarda *bla*_{SHV} geni bulunurken; 12 (%33,33) izolatta *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV} birlikte pozitif saptanmıştır. On dokuz (%52,78) izolatta *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} birlikte pozitif saptanmıştır. *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} elektroforez görüntüsü Şekil 6.2, 6.3 ve 6.4'tedir. İzolatların GSBL dağılımı Tablo 6.5'te verilmiştir.

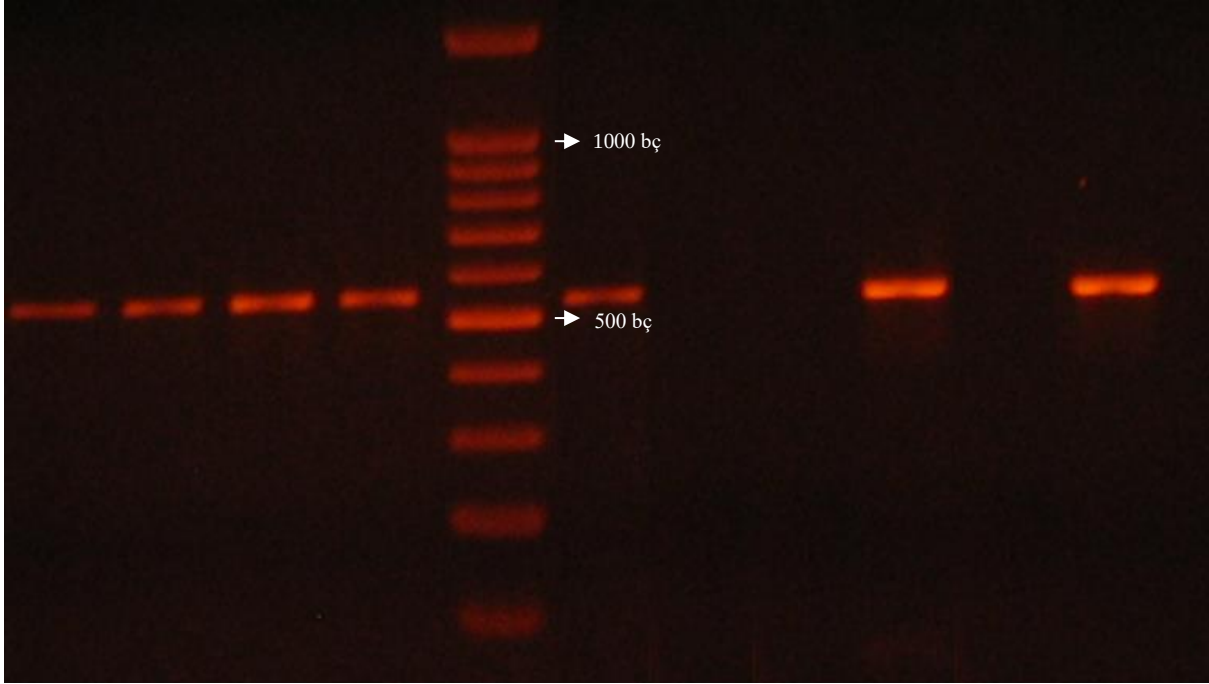
Ç21 Ç22 Ç23 Ç24 Ç25 Y1 Ç26 Ç27 M Y2 Y3 Y4 Ç28 Y5 Y6 Ç29 Ç30



Ç: çocuk, Y: yemidoğan, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, AK: amikasin, GN: gentamisin, KOL: kolistin
M: moleküler büyüklük belirteci (100bp plus DNA ladder, GeneRuler, ABD), *bla*_{SHV} :1016 bp

Şekil 6.2. *bla*_{SHV} elektroforez görüntüsü

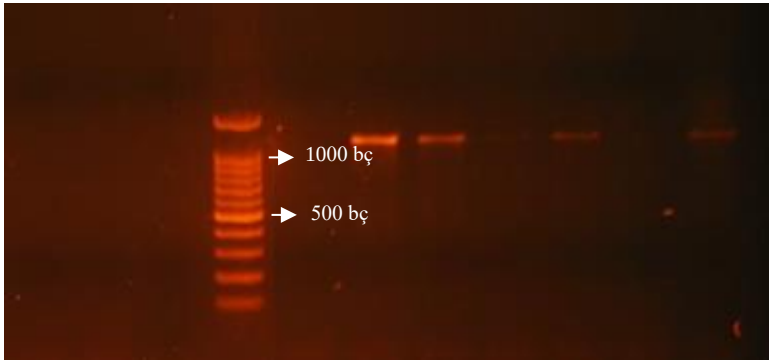
Ç26 Ç27 Y2 Y3 M Y4 Ç28 Y5 Y6 Ç29 Ç30



M: moleküler büyüklük belirteci (100bp DNA ladder, Bioron Almanya), *bla*_{CTX-M}: 550 bç

Şekil 6.3. *bla*_{CTX-M} elektroforez görüntüsü

Ç13 Ç14 Ç15 M Ç19 Ç20 Ç21 Ç22 Ç23 Ç24 Ç25



M: moleküler büyüklük belirteci (100bp DNA ladder, Bioron Almanya), *bla*_{TEM}: 1074 bç

Şekil 6.4. *bla*_{TEM} elektroforez görüntüsü

Tablo 6.5. *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL dağılımı

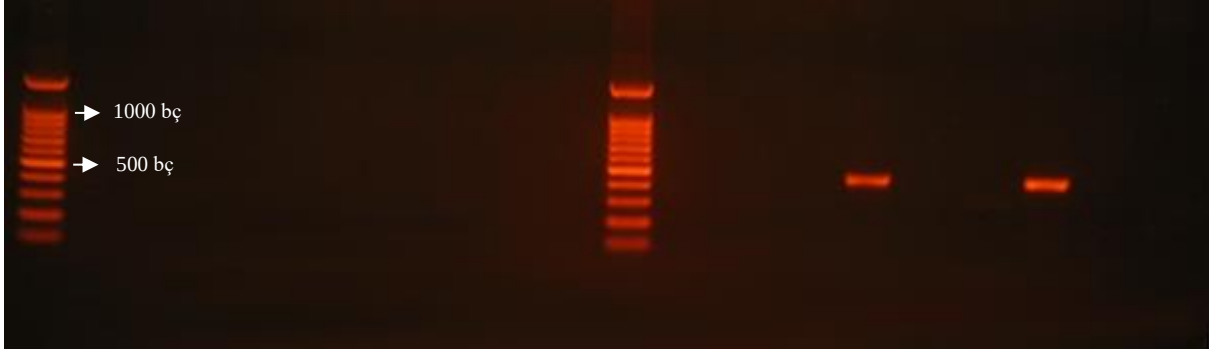
Örnek no	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{TEM}
Ç1	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç2	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç3	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç4	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç5	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç6	R	R	R	R	R	R	+	-	-
Ç7	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Ç8	R	R	S	R	R	R	+	+	-
Ç9	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Ç10	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç11	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç12	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç13	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Ç14	R	R	S	R	R	R	+	+	-
Ç15	R	R	S	R	R	R	+	+	-
Ç16	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç17	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç18	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç19	R	R	S	R	R	R	+	+	-
Ç20	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç21	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç22	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç23	R	R	S	R	R	R	+	+	+
Ç24	R	R	R	R	R	R	+	-	-
Ç25	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Ç26	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Ç27	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Ç28	R	R	R	R	R	R	+	-	-
Ç29	R	R	R	R	R	R	+	-	-
Ç30	R	R	S	R	R	R	+	+	-
Y1	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Y2	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Y3	R	R	R	R	R	R	+	+	+
Y4	R	R	R	R	R	R	+	+	-
Y5	R	R	R	R	R	R	+	-	-
Y6	R	R	R	R	R	R	+	+	+

Ç: çocuk, Y: yenidoğan, AMC: amoksisilin klavulanat, PTZ: piperasilin tazobaktam, FOX: sefoksitin, CTX: sefotaksim, CAZ: seftazidim, FEP: sefepim, S: duyarlı, R: dirençli

6.4.2. AmpC Beta-Laktamaz PZR Sonuçları

Multipleks PZR sonucuna göre ÇYBÜ’nde yatmakta olan hastalardan elde edilmiş 2 (%5,55) izolatın (Ç28 ve Ç29) CIT grubu AmpC beta laktamaz kodlayan gen taşıdığı görülmüştür. Araştırılan diğer AmpC beta laktamazlar ise tüm izolatlarda negatif saptanmıştır. Jel elektroforezi görüntüsü Şekil 6.5’te gösterilmiştir.

M Ç20 Ç21 Ç22 Ç23 Ç24 Ç25 Y1 Ç26 Ç27 M Y2 Y3 Y4 Ç28 Y5 Y6 Ç29 Ç30 Ç9



M: moleküler büyüklük belirteci (100bp DNA ladder, Bioron, Almanya), CIT grubu AmpC beta-laktamaz: 520 bp

Şekil 6.5. AmpC beta-laktamaz elektroforez görüntüsü

6.4.3. Karbapenemaz PZR Sonuçları

Multipleks PZR ile araştırılan 11 karbapenemaz geninden; *bla_{OXA-48}* 33 (%91,67), *bla_{NDM}* ve *bla_{KPC}* birer (%2,78) örnekte pozitif bulunmuştur. Diğer karbapenemaz genleri ya da gen birliktelikleri bulunmamıştır. Bir izolatta (Ç7) karbapenemaz geni varlığı gösterilmemiştir. Jel elektroforezine ait görüntü Şekil 6.6’dadır. İzolatların karbapenemaz dağılımı Tablo 6.6’da verilmiştir.

Şekil 6.6. Karbapenemaz elektroforez görüntüsü

Örnek no	AMC	PTZ	FOX	CTX	CAZ	FEP	ETP	IMP	MEM	KPaz
Ç1	R	R	S	R	R	R	= 0,25	= 2	= 0,5	OXA-48-benzeri
C2	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç3	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç4	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç5	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç6	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	NDM
Ç7	R	R	R	R	R	R	= 16	= 2	= 4	-
Ç8	R	R	S	R	R	R	= 0,5	= 1	= 0,5	OXA-48-benzeri
Ç9	R	R	R	R	R	R	>32	=8	=16	OXA-48-benzeri
Ç10	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç11	R	R	S	R	R	R	= 1	= 2	= 0,25	OXA-48-benzeri
Ç12	R	R	S	R	R	R	= 0,5	= 2	= 0,25	OXA-48-benzeri
Ç13	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç14	R	R	S	R	R	R	= 1	= 2	= 0,25	OXA-48-benzeri
Ç15	R	R	S	R	R	R	= 1	= 2	= 0,25	OXA-48-benzeri
Ç16	R	R	S	R	R	R	= 1	= 2	= 1	OXA-48-benzeri
Ç17	R	R	S	R	R	R	= 0,5	= 1	= 0,125	OXA-48-benzeri
Ç18	R	R	R	R	R	R	= 4	= 2	= 0,5	OXA-48-benzeri
Ç19	R	R	S	R	R	R	= 2	= 1	= 1	OXA-48-benzeri
Ç20	R	R	R	R	R	R	= 8	= 32	= 2	OXA-48-benzeri
Ç21	R	R	S	R	R	R	= 1	= 4	= 4	OXA-48-benzeri
Ç22	R	R	R	R	R	R	= 2	= 4	= 0,5	OXA-48-benzeri
Ç23	R	R	S	R	R	R	>32	= 2	= 4	OXA-48-benzeri
Ç24	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç25	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç26	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç27	R	R	R	R	R	R	>32	>32	= 2	OXA-48-benzeri
Ç28	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç29	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Ç30	R	R	S	R	R	R	= 0,5	= 2	= 0,125	OXA-48-benzeri
Y1	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Y2	R	R	R	R	R	R	= 4	>32	= 1	OXA-48-benzeri
Y3	R	R	R	R	R	R	>32	>32	= 4	OXA-48-benzeri
Y4	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	OXA-48-benzeri
Y5	R	R	R	R	R	R	>32	>32	>32	KPC
Y6	R	R	R	R	R	R	= 16	= 32	= 2	OXA-48-benzeri

57

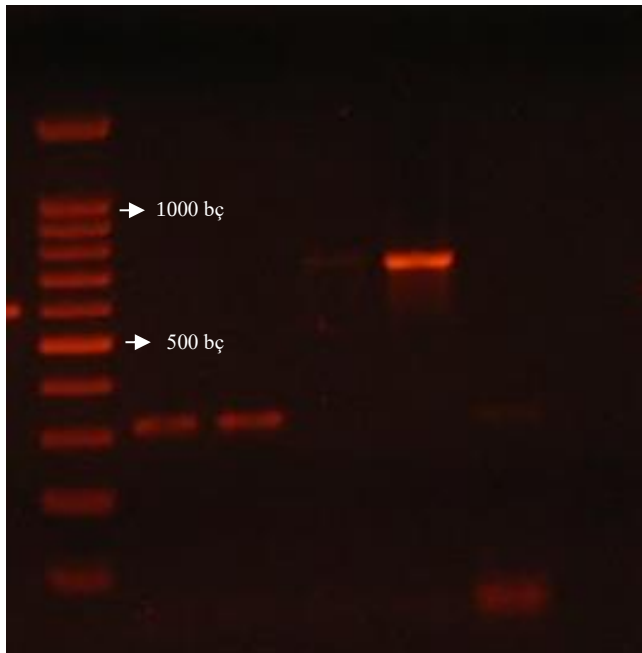
OXA-48 benzeri tip karbapenemaz üreten izolatların beşi (%15,15) (Ç1, Ç8, Ç12, Ç17, Ç30) karbapenemlere duyarlı saptanırken, altısı (%18,18) (Ç11, Ç14, Ç15, Ç16, Ç18, Ç19) yalnızca ertapeneme dirençli, dördü (%12,12) (Ç20, Ç27, Y2, Y6) ertapenem ve imipeneme dirençli, kalan 4 (%42,42) izolat ise her üç karbapeneme de dirençli bulunmuştur. NDM tipi (Ç6) ve KPC tipi (Y5) karbapenemaz üreten iki izolatın ertapenem, imipenem ve meropenem MİK değerleri >32 µg/mL olarak belirlenmiştir.

bla_{NDM} genine sahip olduğu gösterilen Ç6 numaralı izolatın CIM testi ile karbapenemaz üretimi negatif saptanmıştır yine karbapenemaz üretimi fenotipik olarak negatif bulunan Ç7 numaralı izolatın genotipik olarak da karbapenemaz geni varlığı gösterilmemiştir. Bu izolatta, beta-laktamaz genlerinden *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}* bulunduğu gösterilmiştir.

6.4.4. Aminoglikozit Direnç Genlerinin Saptanmasına Yönelik PZR Sonuçları

16S rRNA metiltransferaz genlerinden *armA* ve *rmtC* çocuk yoğun bakım ünitesinden sırasıyla 3 (%8,33) ve 2 (%5,56) izolatta saptanırken, *rmtB* ve *rmtF* genleri her iki yoğun bakım ünitesi izolatlarında da bulunmamıştır. Jel elektroforezi görüntüsü Şekil 6.7'dedir. 16S rRNA metiltransferaz genlerinin dağılımı Tablo 6.7'de verilmiştir.

M Ç5 Ç25 Ç28 Ç29 Ç26



M: moleküler büyüklük belirteci (100bp DNA ladder, Bioron, Almanya), *armA*: 315 bç, *rmtC*: 711 bç

Şekil 6.7. 16S rRNA metiltransferaz jel elektroforezi

armA saptanan üç izolatin (Ç5, Ç25, Ç26) ve *rmtC* saptanan iki izolatin (Ç28 ve Ç29) aminoglikozit MİK değerleri >256 µg/mL bulunmuştur. 16S rRNA metiltransferaz genleri pozitif saptanan beş izolatin tamamı *bla*_{OXA-48 benzeri} karbapenemaz geni taşımaktadır.

Tablo 6.7. *K. pneumoniae* izolatlarının 16S rRNA metiltransferaz genlerinin dağılımı

Örnek nu.	AK	GN	TOB	<i>armA</i>	<i>rmtB</i>	<i>rmtC</i>	<i>rmtF</i>
Ç1	= 0,25	= 0,25	= 0,125	-	-	-	-
Ç2	= 32	= 1	= 32	-	-	-	-
Ç3	= 4	= 64	= 32	-	-	-	-
Ç4	= 4	>256	= 128	-	-	-	-
Ç5	>256	>256	= 128	+	-	-	-
Ç6	= 0,5	= 1	= 1	-	-	-	-
Ç7	= 8	>256	>256	-	-	-	-
Ç8	= 8	>256	>256	-	-	-	-
Ç9	= 32	>256	= 32	-	-	-	-
Ç10	= 64	= 2	= 128	-	-	-	-
Ç11	= 4	>256	= 128	-	-	-	-
Ç12	= 4	>256	= 128	-	-	-	-
Ç13	>256	>256	= 8	-	-	-	-
Ç14	= 4	>256	= 64	-	-	-	-
Ç15	= 4	>256	= 64	-	-	-	-
Ç16	= 2	>256	= 64	-	-	-	-
Ç17	= 32	>256	= 256	-	-	-	-
Ç18	= 2	>256	= 64	-	-	-	-
Ç19	= 2	= 128	= 64	-	-	-	-
Ç20	= 4	>256	= 128	-	-	-	-
Ç21	= 8	>256	= 128	-	-	-	-
Ç22	= 8	>256	= 128	-	-	-	-
Ç23	= 2	>256	= 128	-	-	-	-
Ç24	= 2	= 0,5	= 32	-	-	-	-
Ç25	>256	>256	>256	+	-	-	-
Ç26	>256	>256	>256	+	-	-	-
Ç27	= 2	>256	= 128	-	-	-	-
Ç28	>256	>256	>256	-	-	+	-
Ç29	>256	>256	>256	-	-	+	-
Ç30	= 2	= 0,5	= 16	-	-	-	-
Y1	= 8	>256	= 128	-	-	-	-
Y2	= 4	>256	= 64	-	-	-	-
Y3	= 2	>256	= 64	-	-	-	-
Y4	= 1	= 0,5	= 1	-	-	-	-
Y5	= 1	= 1	= 0,5	-	-	-	-
Y6	= 2	>256	= 32	-	-	-	-

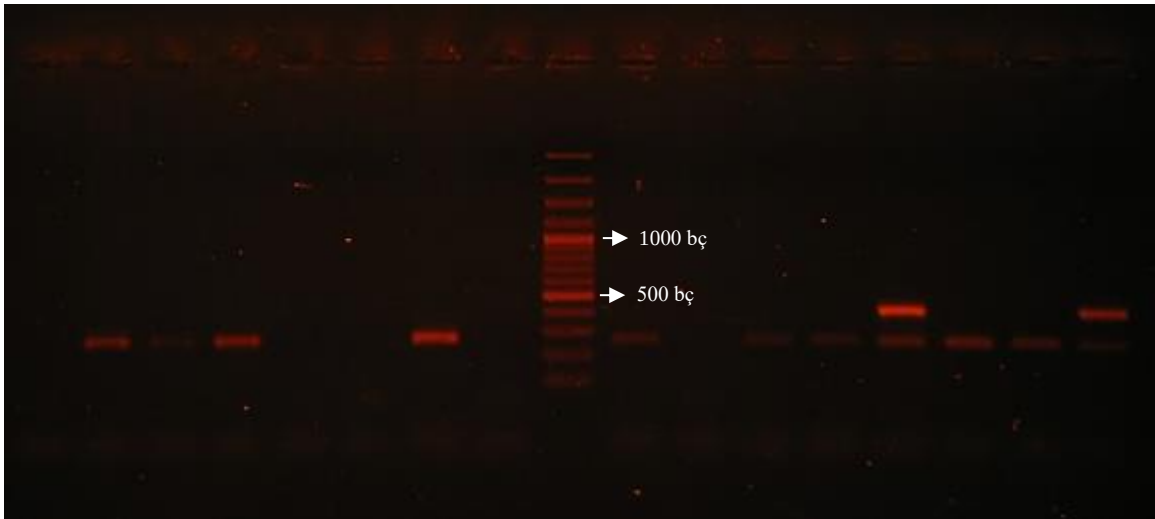
Ç: çocuk, Y: yenidoğan, AK: amikasin, GN: gentamisin, TOB: tobramisin

6.4.5. Plazmit Aracılı Kinolon Direnç Genlerinin Saptanmasına Yönelik PZR Sonuçları

İzolatlarda araştırılan plazmit aracılı kinolon direnç genlerinden *qnrB* 19 (%52,78) izolatta tek başına pozitif saptanmış, bu izolatların 18'i (%94,73) siprofloksasine, sekizi (%47,36) levofloksasine dirençli bulunmuştur. *qnrS* 6 (%16,67) izolatta tek başına pozitif bulunmuştur, bunların dördünün (%66,66) siprofloksasine ve levofloksasine dirençli olduğu görülmüştür. *qnrB* ve *qnrS* birlikteliğinin görüldüğü iki (%5,56) izolatta siprofloksasin MİK değeri >32 µg/mL ve levofloksasin MİK değeri 8 µg/mL bulunarak her ikisinin de dirençli kategorisinde olduğu belirlenmiştir. Tüm örneklerde *qnrA*, *qnrC* ve *qepA* negatiftir. *qnr* taşımayan izolatların, beşi (%55,55) siprofloksasine, üçü (%33,33) levofloksasine dirençli saptanmıştır. Jel elektroforezi görüntüsü Şekil 6.8'dedir. İzolatların plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin dağılımı ve florokinolon grubu antimikrobiyallerle ilişkisi Tablo 6.8'de verilmiştir.

*bla*_{OXA-48} benzeri taşıyan izolatların 17'si (%51,51) *qnrB*, 5'i (%15,15) *qnrS*, 2'si (%6,06) *qnrB* ve *qnrS* taşımaktadır. *bla*_{NDM} taşıyan bir izolat aynı zamanda *qnrS*, *bla*_{KPC} taşıyan bir izolat da aynı zamanda *qnrB* geni taşımaktadır.

Ç20 Ç21 Ç22 Ç23 Ç24 Ç25 Y1 Ç26 M Ç27 Y2 Y3 Y4 Ç28 Y5 Y6 Ç30



M: moleküler büyüklük belirteci (100bp DNA ladder, Bioron, Almanya), *qnrB*: 264 bp, *qnrS*: 428 bp

Şekil 6.8. Plazmit aracılı kinolon direnç genleri jel elektroforezi

Tablo 6.8. *K. pneumoniae* izolatlarının plazmit aracılı kinolon direnç genlerinin dağılımı

Örnek no	CIP	LEV	<i>qnrA</i>	<i>qnrB</i>	<i>qnrC</i>	<i>qnrS</i>	<i>qepA</i>
Ç1	= 0,25	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç2	>32	>32	-	-	-	+	-
Ç3	>32	= 2	-	-	-	-	-
Ç4	>32	>32	-	+	-	-	-
Ç5	>32	>32	-	-	-	+	-
Ç6	= 0,25	= 0,25	-	-	-	+	-
Ç7	>32	= 16	-	+	-	-	-
Ç8	= 16	= 8	-	+	-	-	-
Ç9	>32	= 16	-	-	-	+	-
Ç10	= 0,032	= 0,064	-	-	-	+	-
Ç11	= 4	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç12	= 4	= 0,5	-	-	-	-	-
Ç13	= 32	= 32	-	-	-	+	-
Ç14	= 4	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç15	= 4	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç16	>32	= 4	-	+	-	-	-
Ç17	= 0,125	= 0,125	-	-	-	-	-
Ç18	>32	= 4	-	+	-	-	-
Ç19	= 4	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç20	= 0,125	= 0,064	-	-	-	-	-
Ç21	>32	= 16	-	+	-	-	-
Ç22	>32	= 16	-	+	-	-	-
Ç23	>32	= 1	-	+	-	-	-
Ç24	>32	>32	-	-	-	-	-
Ç25	>32	>32	-	-	-	-	-
Ç26	>32	>32	-	-	-	-	-
Ç27	= 2	= 0,5	-	+	-	-	-
Ç28	>32	= 8	-	+	-	+	-
Ç29	>32	= 8	-	+	-	+	-
Ç30	= 0,064	= 0,064	-	-	-	-	-
Y1	>32	= 1	-	+	-	-	-
Y2	= 0,25	= 0,125	-	-	-	-	-
Y3	>32	= 2	-	+	-	-	-
Y4	= 2	= 1	-	+	-	-	-
Y5	>32	>32	-	+	-	-	-
Y6	= 16	= 2	-	+	-	-	-

Ç: çocuk, Y: yenidoğan, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin

6.4.6. Plazmit Aracılı Kolistin Direnç Genlerinin PZR Yöntemiyle Saptanması

Tüm izolatlarda *mcr1-5* negatif bulunmuştur.

6.5. *mgrB* Kromozomal Gen Mutasyonlarının Sonuçları

Kolistin dirençli izolatların *mgrB* allelerine ait nükleotit dizileri, karşılık gelen protein dizileri Tablo 6.9 ve 6.10'da verilmiştir. Elde edilen diziler *K. pneumoniae* NH53 (erişim no: KF852760) suşuna ait vahşi tip *mgrB* dizisi ile karşılaştırılmış ve tüm izolatlara ait *mgrB* genlerinde mutasyon gösterilmiştir.

83. nükleotitte meydana gelen timin-guanin (T83G) değişimi, Ç3, Ç5, Ç9, Ç10, Ç13, Ç24 ve Ç25'te görülmüş ve karşılık gelen proteinin 28. aminoasiti olan fenilalaninin sistein ile değişmesine yol açmıştır. Ç2'de görülen A7T değişimi ile protein erken sonlanmış, kısa ve fonksiyonsuz bir protein oluşmuştur. Ç3'te 84. ve Ç17'de 73. pozisyona *E.coli* kökenli IS1 ailesine ait katılım dizisinin (insersiyon sekansı) eklendiği ve her ikisinde de *mgrB* geninin katılımsal inaktivasyonu ile fonksiyonsuz proteinler oluşturduğu saptanmıştır (134). Ç4 ve Ç7'de 7.sırada adenin delesyonu çerçeve kayması mutasyonuna neden olmuş ve kısa, fonksiyonsuz bir protein oluşmuştur. Ç5 ve Ç25'te C88T değişimi dur kodonu oluşumuna neden olmuş ve protein erken sonlanmıştır. Ç13'te ise 121. pozisyonda adenin yerine guanin geçmesi nedeniyle protein dizisinde 41.sırada izolösin yerine valin bulunmaktadır (Tablo 6.11).

Tablo 6.9. *mgrB* allellerine ait nükleotit dizileri

	1	10	20	30	40	50	60
NH53	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç2	GTGAAATTAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç3	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç4	GTGAAA--AATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç5	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç7	GTGAAA--AATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç9	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç10	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç13	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç17	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç24	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
Ç25	GTGAAAAAATTACGGTGGGTTTTACTGATAGTCATCATAGCAGGCTGCCTGTTGCTGTGG						
	70	80	90	100	110	120	
NH53	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTTTCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç2	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç3	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTG-----						
Ç4	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç5	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACTTAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç7	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç9	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç10	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç13	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç17	ACTCAGATGCTT-----						
Ç24	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACCAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
Ç25	ACTCAGATGCTTAACGTAATGTGCGACTTAGGATGTTTCAGTTTTTCAGCGGCATTTGCACT						
	130	140					
NH53	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç2	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç3	-----						
Ç4	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç5	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç7	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç9	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç10	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç13	GTTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç17	-----						
Ç24	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						
Ç25	ATTAATAAAATTTATTCCGTGGTAA						

Nükleotit sıra numaraları yukarıda belirtilmiştir. Nükleotit değişimleri kırmızı ile işaretlenmiştir. Nükleotit delesyonları kırmızı çizgi, katılım dizileri kesikli çizgi ile gösterilmiştir.

Tablo 6.10. *mgrB* proteinlerine ait aminoasit dizileri

Aminoasit					
nu.	1	10	20	30	40
NH53	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMFDQDVQFFSGICTINKFIPW*				
Ç2	MK*				
Ç3	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCGDAANLLI*				
Ç4	MKNYGGFT*				
Ç5	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCD*				
Ç7	MKNYGGFT*				
Ç9	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*				
Ç10	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*				
Ç13	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTVNFIPW*				
Ç17	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLGNDSNLLIVFYVQIMPADFVMGLHAF*				
Ç24	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCDQDVQFFSGICTINKFIPW*				
Ç25	MKKLRWVLLIVIIAGCLLLWTQMLNVMCD*				

*dur kodonuna karşılık olarak kullanılmıştır. Vahşi tip *mgrB* dizisi ile farklılıklar kırmızı ile işaretlenmiştir.

Tablo 6.11. *K. pneumoniae* izolatlarında saptanan *mgrB* mutasyonları

İzolat	Kolistin MİK (mcg/ml)	<i>mgrB</i> mutasyonu
Ç2	8	A7T , T83G
Ç3	16	T83G , IS1 insersiyonu
Ç4	8	A7 delesyonu, T83G
Ç5	64	T83G , C88T
Ç7	4	A7 delesyonu, T83G
Ç9	16	T83G
Ç10	32	T83G
Ç13	16	T83G , A121G
Ç17	32	IS1 insersiyonu
Ç24	8	T83G
Ç25	8	T83G , C88T

6.6. Kapsül Tiplendirme Sonuçları

İzolatlara *wzi* geni dizi analizi uygulanmıştır. Elde edilen veriler Snapgene viewer programı ile görüntülenmiş ve değerlendirilmiştir. FASTA formatındaki baz dizileri, BIGSdb-Pasteur *Klebsiella pneumoniae* allel ve profil veri tabanında aranarak eşleşen alleller bulunmuştur. Bulunan alleller ile ilişkili kapsüler tipler de aynı veri tabanında belirlenmiştir (130). İzolatların *wzi* allelleri ve ilişkili kapsüler tipleri Tablo 6.12’de verilmiştir.

Tablo 6.12. *K. pneumoniae* izolatlarının wzi allelleri ve kapsüler tipleri

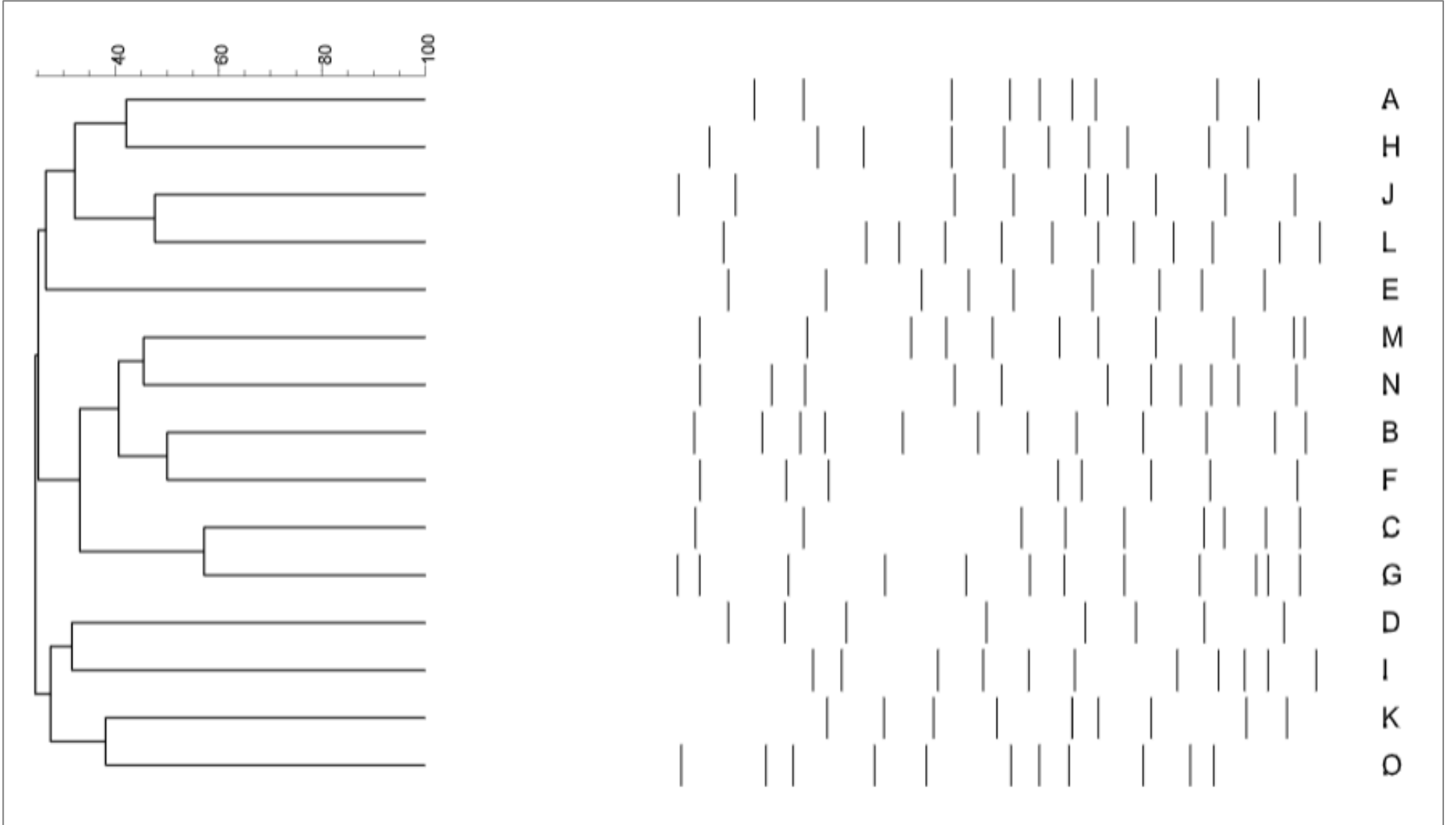
İzolat numarası	wzi alleli	Kapsüler tip
Ç1, Ç7	39	K39
Ç2, Ç4, Ç5, Ç25, Ç26	64	K14.K64
Ç3	50	K15.K17.K50.K51.K52
Ç6	37	K22.37
Ç8	110	-
Ç9, Ç11, Ç12, Ç14, Ç15, Ç16, Ç18, Ç19, Ç20, Ç21, Ç22, Ç24, Ç27, Y1, Y2, Y3, Y4, Y6	2	K2
Ç10	211	KL109
Ç13	137	K17
Ç17, Y5	173	KL102
Ç23	408	K2
Ç28	373	-
Ç29, Ç30	452	-

Ç: çocuk, Y: yenidoğan

En sık saptanan kapsüler tip K2 olarak belirlenmiştir, bu kapsüler tip izolatların 19’unda (%52,78) bulunmaktadır. Beş (%13,89) izolatın kapsüler tipi K.14.K64 olarak bulunmuştur.

6.7. PFGE Sonuçları

K. pneumoniae izolatlarından 17’si (%47,22) %100 uyum göstererek patern A olarak kümelenmiştir. 3 (%8,33) izolat patern B, 2 (%5,56) izolat patern C, 2 (%5,56) izolat patern D ve 2 (%5,56) izolat patern E olarak belirlenmiştir. Farklı paternlere ait izolatların birbiriyle benzerliği %70’in altında bulunmuştur. Herhangi bir gruba dahil olmayan 10 izolatın (patern F-O) da birbirleri ve diğer paternlerle olan benzerliklerinin %70’in altında olduğu görülmüştür. Oluşturulan dendogram Şekil 6.9’da verilmiştir.



Şekil 6.9. Farklı PFGE grupları ile elde edilen dendrogram

6.8. MLST Sonuçları

K. pneumoniae izolatların 18'i (%50,00) ST14 olarak tanımlanmıştır, 3 izolat (%8,33) ST2096, 2'ser izolat ST661, ST147 ve ST985 olarak belirlenmiştir. Birer örnek ise; ST37, ST152, ST101, ST17, ST307 ve ST39 olarak bulunmuştur. Ç9 numaralı izolat için allelik profil; *gapA*: 1, *infB*: 6, *mdh*:1, *pgi*: 1, *phoE*: 1, *rpoB*: 70, *tonB*: 1 olarak tanımlanmış ancak veri tabanında karşılık gelen ST bulunamamıştır. Ç6 numaralı izolat için ise *rpoB* alleli muhtemelen yeni bir allel tipi olması nedeniyle veri tabanında bulunamamıştır. İzolatın diğer allelik profili; *gapA*: 2 , *infB*: 1, *mdh*: 2, *pgi*:1 , *phoE*: 10, *tonB*: 19 olarak bulunmuştur.

ST14 olarak tanımlanan izolatların 17'si PFGE ile aynı paternde saptanmıştır. Bu izolatların karbapenem, florokinolon ve aminoglikozit duyarlılık kategorileri değişken olmakla birlikte tamamı gentamisin ve tobramisine dirençlidir. Hiçbirinde kolistin direnci yoktur. Tamamında *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz geni, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve 11 (%30,55)'inde *bla*_{TEM} geni bulunurken, AmpC tipi beta laktamazlar saptanmamıştır. Bu izolatlarda 16S rRNA metiltransferazlar saptanmazken, 14'ünde (%38,88) *qnrB* geni gösterilmiştir. Bu sekans tipinde yer alan izolatların *wzi* allelleri kapsüler tip 2 ile ilişkilendirilmiştir.

ST2096 olarak tanımlanan ve PFGE ile aynı paterne sahip olduğu belirlenen her üç izolat da, test edilen karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozitlere direnç göstermektedir. İkisinde kolistin direnci de eşlik etmekteyken, biri kolistine duyarlıdır. Bu izolatlarda da *bla*_{OXA-48}-benzeri karbapenemaz geninin yanında *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} saptanmıştır. İki (%66,67) izolat *bla*_{TEM} geni taşımaktadır. Tümünde *armA* 16S rRNA metiltransferaz gösterilmiştir. İzolatların birinde (%33,33) *qnrS* geni saptanmıştır. Kolistine *mgrB* geninde tek nükleotit değişiklikleri ile direnç göstermektedirler. Bu sekans tipinde yer alan izolatların *wzi* alleli 64 ve kapsüler tipi K14.K64 olarak saptanmıştır.

ST661 olarak saptanan ve aynı PFGE paternine sahip iki izolat, karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozitlere direnç göstermektedir ancak kolistine duyarlıdır. *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz, *bla*_{SHV} ve CIT grubu AmpC beta laktamaz geni taşımaktadır. Tümünde *rmtC* 16S rRNA metiltransferaz, *qnrB* ve *qnrS* gösterilmiştir. *wzi* allelleri 373 bulunmuştur ve bu allelin ilişkili olduğu kapsüler tip veri tabanında bulunmamaktadır. Farklı bir PFGE paternine sahip olan izolat ise, karbapenemlere ve kolistine dirençliyken, kinolonlara ve gentamisine duyarlıdır, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *qnrS* taşımaktadır. *mgrB* protein dizisinde ise F28C değişimi bulunmaktadır, *wzi* allel 211 ile ilişkilendirilmiştir.

ST147 olarak saptanan iki izolat karbapenemlere, florokinolonlara ve kolistine dirençlidir. Bu izolatlar, *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz geninin yanında *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} geni taşımaktadırlar. İzolatların birinde (%50,00) *qnrS* geni, birinde (%50,00) *qnrB* geni saptanmıştır. *mgrB* genlerinde nükleotit delesyonu ve tek nükleotit değişimi gösterilmiştir. *wzi* allelleri, *wzi* 64 ve kapsüler tipleri K14.K64 olarak bulunmuştur.

ST985 olarak belirlenen iki izolat ise, değişken antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına sahiptir. Bu izolatlardan biri *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz geninin yanında *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} taşımaktayken diğer izolatta karbapenemaz geni bulunmamış, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} beta-laktamazlar gösterilmiştir. Her ikisinde de *qnrB* geni bulunmaktayken, kolistine dirençli olan izolatın *mgrB* geninde nükleotit delesyonu ve tek nükleotit değişimi bulunmaktadır. Bu suşlar, *wzi* 37 alleli taşıdıklarından kapsüler tip K37 ile ilişkilendirilmişlerdir.

İzolatların sekans tipleri ve moleküler özellikleri Tablo 6.13'te verilmiştir.

Tablo 6.13. *K. pneumoniae* izolatlarının sekans tipleri ve moleküler özellikleri

Suş	ETP	IMP	MEM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	KOL	GSBL	AmpC	KPaz	PAKD	RMT	<i>mgrB</i> mutasyonu	PFGE	ST
Ç11	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=128 R	=4 R	=0,5 S	=1 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç12	=0,5 S	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=128 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	-	A	14
Ç14	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç15	=1 R	=2 S	=0,25 S	=4 S	>256 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç16	=1 R	=2 S	=1 S	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=4 R	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç18	=4 R	=2 S	=0,5 S	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=4 R	=1 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç19	=2 R	=1 S	=1 S	=2 S	=128 R	=64 R	=4 R	=0,5 S	=1 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç20	=8 R	=32 R	=2 S	=4 S	>256 R	=128 R	=0,125 S	=0,064 S	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	-	A	14
Ç21	=1 R	=4 I	=4 I	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=16 R	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç22	=2 R	=4 I	=0,5 S	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=16 R	=2 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç23	>32 R	=2 S	=4 I	=2 S	>256 R	=128 R	>32 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Y1	>32 R	>32 R	>32 R	=8 S	>256 R	=128 R	>32 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç27	>32 R	>32 R	=2 S	=2 S	>256 R	=128 R	=2 R	=0,5 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Y2	=4 R	>32 R	=1 S	=4 S	>256 R	=64 R	=0,25 S	=0,125 S	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	-	-	A	14
Y3	>32 R	>32 R	=4 I	=2 S	>256 R	=64 R	>32 R	=2 R	=1 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Y4	>32 R	>32 R	>32 R	=1 S	=0,5 S	=1 S	=2 R	=1 I	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Y6	=16 R	=32 R	=2 S	=2 S	>256 R	=32 R	=16 R	=2 R	=2 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	A	14
Ç24	>32 R	>32 R	>32 R	=2 S	=0,5 S	=32 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV	-	OXA-48 benzeri	-	-	T83G	M	14
Ç5	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	=128 R	>32 R	>32 R	=64 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	armA	T83G, C88T	B	2096
Ç25	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	armA	T83G, C88T	B	2096
Ç26	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	=0,5 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	armA	-	B	2096

70 **Tablo 6.13.** *K. pneumoniae* izolatlarının sekans tipleri ve moleküler özellikleri (devamı)

Suş	ETP	IMP	MEM	AK	GN	TOB	CIP	LEV	KOL	GSBL	AmpC	KPaz	PAKD	RMT	<i>mgrB</i> mutasyonu	PFGE	ST
Ç28	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	=8 R	=0,5 S	SHV	CIT	OXA-48 benzeri	qnrB, qnrS	rmtC	-	C	661
Ç29	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	=8 R	=1 S	SHV	CIT	OXA-48 benzeri	qnrB, qnrS	rmtC	-	C	661
Ç10	>32 R	>32 R	>32 R	=64 R	=2 S	=128 R	=0,032 S	=0,064 S	=32 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	T83G	J	661
Ç2	>32 R	>32 R	>32 R	=32 R	=1 S	=32 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	A7T, T83G	D	147
Ç4	>32 R	>32 R	>32 R	=4 S	>256 R	=128 R	>32 R	>32 R	=8 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	A7 delesyonu, T83G	D	147
Ç1	=0,25 S	=2 S	=0,5 S	=0,25 S	=0,25 S	=0,125 S	=0,25 S	=0,5 S	=2 S	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	E	985
Ç7	=16 R	=2 S	=4 I	=8 S	>256 R	>256 R	>32 R	=16 R	=4 R	SHV, CTX-M	-	-	qnrB	-	A7 delesyonu, T83G	E	985
Ç3	>32 R	>32 R	>32 R	=4 S	=64 R	=32 R	>32 R	=2 R	=16 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	T83G, C88T	F	37
Ç6	>32 R	>32 R	>32 R	=0,5 S	=1 S	=1 S	=0,25 S	=0,25 S	=2 S	SHV	-	NDM	qnrS	-	-	G	-
Ç8	=0,5 S	=1 S	=0,5 S	=8 S	>256 R	>256 R	=16 R	=8 R	=1 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrB	-	-	H	152
Ç9	>32 R	=8 R	=16 R	=32 R	>256 R	=32 R	>32 R	=16 R	=16 R	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	T83G	I	-
Ç13	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	=8 R	=32 R	=32 R	=16 R	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	qnrS	-	T83G, A121G	K	101
Ç17	=0,5 S	=1 S	=0,25 S	=32 R	>256 R	=256 R	=0,125 S	=0,125 S	=32 R	SHV, CTX- M, TEM	-	OXA-48 benzeri	-	-	IS1 insersiyonu	L	17
Y5	>32 R	>32 R	>32 R	=1 S	=1 S	=0,5 S	>32 R	>32 R	=1 S	SHV	-	KPC	qnrB	-	-	N	307
Ç30	=0,5 S	=2 S	=0,064 S	=2 S	=0,5 S	=16 R	=0,064 S	=0,064 S	=2 S	SHV, CTX-M	-	OXA-48 benzeri	-	-	-	O	39

Ç: çocuk, Y: yenidoğan, ETP: ertapenem, IMP: imipenem, MEM: meropenem, CIP: siprofloksasin, LEV: levofloksasin, AK: amikasin, GN: gentamisin, TOB: tobramisin, KOL: kolistin, S: duyarlı, I: artmış dozda duyarlı, R: dirençli, GSBL: genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz, AmpC: AmpC beta-laktamaz, Kpaz: karbapenemaz, PAKD: plazmid aracılı kinolon direnci genleri, RMT: 16S rRNA metiltransferaz, PFGE: pulsed field jel elektroforezi, ST: sekans tipi

7. TARTIŞMA

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle yenidoğanlar başta olmak üzere çocuk hastalar için dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunudur (134). Bu izolatlar hastanelerde hızlı bir yayılım göstermekte ve antimikrobiyal direnç genlerini plazmitler ile diğer gram negatif bakterilere aktarmaktadırlar. Bu özellikleri ile, antimikrobiyal direnç oranlarının yükselmesine, salgınlara, hastane yatışlarının uzamasına ve mortalite artışına neden olmaktadır (135, 136).

Çalışmamızda, bir yıllık sürede, çocuk hastalıkları yoğun bakım ünitesinde yatmış ve kültür örneklerinde karbapenem dirençli *K. pneumoniae* üremiş olan 28 hastadan izole edilen 30 ve yenidoğan yoğun bakım ünitesinde yatmış olan 6 hastadan izole edilmiş 6 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının antimikrobiyal duyarlılıkları ve moleküler epidemiyolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

İzole ettiğimiz *K. pneumoniae*'lerin antimikrobiyal direnç oranları değerlendirildiğinde, amoksisilin klavulanat, piperasilin tazobaktam, sefotaksim, seftazidim ve sefepime direnç oranı %100 bulunmuştur. İzolatların 24'ü (%66,66) sefoksitine, 31'i (%86,11) ertapeneme, 21'i (%58,33) imipeneme, 16'sı (%44,44) meropeneme, 10'u (%27,77) amikasin, 28'i (%77,77) gentamisine, 31'i (%86,11) tobramisine, 29'u (%80,55) siprofloksasine ve 19'u (%52,77) levofloksasine dirençli olarak saptanmıştır.

Dursun ve ark. tarafından 2013-2017 yılları arasında çocuk yoğun bakım ünitesinde yatmakta olan hastaların trakeal aspirat ve kan kültürlerinde üreyen 25 *K. pneumoniae* izolatı ile yapılmış çalışmada izolatların %80'i sefepime, %52'si siprofloksasine, %60'ı gentamisine, %28'i meropeneme, %52'si piperasilin tazobaktama dirençli saptanmış, izolatların en duyarlı olduğu antimikrobiyal, amikasin (%96) olarak belirlenmiştir (137). Bizim çalışmamızda, bu antimikrobiyallere direnç oranlarının daha yüksek olduğu bulunmuş, bu durumun yıllar içerisinde antimikrobiyal direnç oranlarının artışı ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Benzer şekilde, izolatlarımızın en duyarlı olduğu antimikrobiyal, amikasin olarak saptanmıştır. Bu durum; amikasinin, tobramisin ve gentamisine göre modifiye edici enzimlerden daha az etkilenmesiyle açıklanabilir.

Öztaş ve ark. tarafından 5 yıllık süreçte izole edilen 709 KDKp izolatında amoksisilin klavulanat direnci %99,78, piperasilin tazobaktam direnci %99,45, sefoksitin direnci %98,68,

seftazidim direnci %98,57, sefepim direnci %98,26, siprofloksasin direnci %94,63, levofloksasin direnci %92,53 ve amikasin direnci %53,12 olarak bulunmuş, bizim çalışmamıza göre siprofloksasin, levofloksasin ve amikasinin direnç oranları daha yüksek saptanmıştır (138). Aminoglikozitler ve florokinolonlar çocuk hastalarda yan etkileri nedeniyle daha az tercih edilmektedir. Bu nedenle, bu antimikrobiyal gruplara direnç oranlarının daha düşük olması beklenmektedir. Ancak çalışmamızda bu antimikrobiyal gruplarına da direnç oranlarının yüksek olması dikkat çekmektedir.

Tian ve ark. tarafından çocuk yaş grubu hastalardan elde edilen 170 karbapenem dirençli izolat değerlendirildiğinde, sefotaksim ve seftazidime %100, ertapeneme %99,41, imipeneme %95,88, meropeneme %95,29, amikasin %58,24, gentamisin %61,76, siprofloksasine %62,94, levofloksasine %61,68'i dirençli olarak belirlenmiştir (139). Bizim çalışmamız ile karşılaştırıldığında, karbapenem, amikasin ve levofloksasin direnç oranlarının daha yüksek olduğu, siprofloksasin ve gentamisin direnç oranının ise daha düşük olduğu görülmüştür. İzolatların taşıdığı aktarılabılır direnç mekanizmalarının çeşitliliği coğrafi bölgelere ve hatta hastaneden hastaneye değişebilmektedir. Bu nedenle, farklı bölgelerde yapılmış çalışmalarda farklı direnç oranlarının saptanması olasıdır.

Çalışmamızda, kolistin ve karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolat sayısı 11 (%30,55) olarak bulunmuştur. Koçak ve ark. tarafından 81 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının %39,51'i, Yiş ve ark. tarafından 108 izolatın %43,8'i, Çaycı ve ark. tarafından 101 izolatın %29,7'si kolistine dirençli bulunmuştur (140, 141). Aygar ve ark. tarafından karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarında kolistin direnci 2015 yılında %36,4, 2016 yılında %35,8 ve 2017 yılında %41,7 olarak belirlenmiştir (142). Dünyada ise özellikle Güneydoğu Asya ülkelerinde kolistin direnci yüksek oranda raporlanmaktadır (143). Hamel ve ark. Yunanistan'da karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının %73,9'una kolistin direncinin de eşlik ettiğini gösterirken; Jafari ve ark., İran'da izole edilmiş 100 karbapenem *K. pneumoniae*'nin değerlendirildiği çalışmada kolistin direnç oranının %50'ye ulaşabildiğini göstermiştir (144, 145). Son tedavi seçeneklerinden biri olarak kullanılan kolistine karşı gelişen direnç, bu konuda önlemlerin alınmasının gerekliliğini göstermektedir. Kolistin tek başına kullanılması yerine, diğer antibiyotiklerle sinerjistik etkisinin değerlendirilmesi ve kombinasyon tedavisi kolistin direncinin önüne geçebilmek için bir seçenek olabilir (140).

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* taramasında Gauthier ve ark. CIM testinin, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yararlı bir yöntem olarak kullanılabileceğini belirtmiştir

(146). Çalışmamızda, 34 izolatın karbapenemaz üretimi CIM testi ile pozitif bulunmuştur. Karbapenemaz PZR bulguları ile karşılaştırıldığında OXA-48 içeren izolatların %100'ünde test sonucu pozitif bulunurken, NDM karbapenemaz geni bulunan izolat CIM testi ile negatif saptanmıştır. Genotipik olarak karbapenemaz varlığı gösterilmeyen izolatta ise CIM testinde de karbapenemaz üretimi negatif bulunmuştur. Tekintaş ve ark.'nın yaptığı çalışmada CIM yöntemi, OXA-48 içeren izolatlarda oldukça düşük oranda (%46.15) pozitif sonuç verirken, *bla*_{NDM} içeren izolatlarda ise karbapenemaz varlığını saptama oranı (%85.71) daha başarılı bulunmuştur (147). Yıldız ve ark. ise OXA-48 üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarında CIM testinin yalancı negatifliğini %2,90 olarak bulmuş, bu nedenle moleküler yöntemler ile negatif sonuçların doğrulanmasını önermiştir (148).

Karbapenemaz oranları, dünyada farklı ülkelerde değişkenlik göstermektedir. Yapılan çalışmalarda en sık KPC, OXA ve NDM enzimleri görülmektedir (149). OXA-48, ilk olarak İstanbul'da bir salgında tanımlanmıştır (150). Ülkemizde endemik olarak bulunan bu karbapenemaz geni, Kuzey Afrika ülkelerinde ve Orta Doğu ülkelerinde de endemiktir (151). Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşlarında ilk olarak izole edilmiş olan KPC enzimi, ABD, İtalya, Yunanistan, İsrail ve Çin' de endemiktir (149). Türkiye'de ilk olarak 2014'te raporlanmış ve günümüze kadar sporadik KPC üreten *K. pneumoniae* vakaları gösterilmiştir (88, 153, 154). Metallobetalaktamazlar, esas olarak İngiltere, Hindistan, Pakistan ve Balkan ülkelerinde raporlanmaktadır, Türkiye'de ise 2011 yılında daha önce Irak'ta hastane yatışı bulunan bir allojenik kemik iliği alıcısında gösterilmiştir (154). Ülkemizde NDM karbapenemazların oranı %6,3 ile %52,9 arasında bildirilmektedir, IMP ve VIM karbapenemazlar da Türkiye'de düşük prevalansta saptanmaktadır (153, 155).

Ülkemizde karbapenemaz genlerini araştıran çalışmalarda da en sık OXA-48 direnç geni, ardından KPC ve NDM genleri raporlanmıştır (147, 156-158). OXA-48 / NDM ve KPC / NDM birliktelikleri de bildirilmiştir (152, 159). Okalın ve ark.'nın yaptığı çalışmada yoğun bakım hastalarından izole edilen en az bir karbapenem dirençli 45 *K. pneumoniae* izolatında %66,6 OXA-48, %4 NDM, %15,5 hem OXA-48 hem NDM, %13,3 KPC pozitif bulunmuştur (157). Telli ve ark. tarafından 291 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının %42,3'ünde NDM+OXA-48 birlikteliği gösterilmiş, %38,8'inde OXA-48, %11'inde NDM, %2,4'ünde KPC ve %1,7'sinde VIM gösterilmiştir (160). Haciseyitoğlu ve ark. 44 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının 33'ünde, Ece ve ark. 14 izolatın tamamında, Parlak ve ark. 47 izolatın 38'inde (%80) *bla*_{OXA-48} genini göstermiştir (156, 161, 162). Bu çalışmamızda, 33 (%91,67) izolatta *bla*_{OXA-48} benzeri, bir (%2,78) izolatta *bla*_{NDM} ve bir (%2,78) izolatta *bla*_{KPC} pozitif

bulunmuştur. Bu bulgular, OXA-48 karbapenemazın ülkemizdeki yaygınlığını gösteren çalışmaları desteklemektedir.

OXA-48 benzeri karbapenemaz geni taşıyan izolatlarda karbapenem minimum inhibitör konsantrasyonlarının, KPC ve MBL üreten izolatlardan daha düşük olduğu literatürde gösterilmiştir (139, 163). OXA-48 enzimleri penisilinleri başarılı bir şekilde parçalarken, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı etkinliği azdır. Benzer şekilde çalışmamızda, OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların MİK değerlerine bakıldığında izolatların %15,15'i tüm karbapenemlere, %27,78'si imipenem ve meropeneme, %12,12'si ise meropeneme duyarlı bulunmuştur. OXA-48 tipi direncin genotipik varlığının doğrudan doğruya fenotipik yansımalarının ortaya çıkmaması nedeniyle bu izolatlarla enfekte hastaların karbapenem tedavisine yanıtları da belirsizdir. Antimikrobiyal duyarlılık testlerinde duyarlı saptanmasına rağmen OXA-48 karbapenemaz üreten izolatlar ile oluşan enfeksiyonlar karbapenem tedavisine yanıt vermeyebilir (164-166). GSBL, AmpC beta laktamazlar ve porin kaybı gibi hücre geçirgenliğini etkileyen değişikliklerin de eşlik etmesi durumunda sefalosporinler ve karbapenemlere yüksek düzeyde direnç görülebilir.

Çalışmamızda, literatür ile uyumlu olarak, NDM üreten izolatta karbapenem MİK değerleri $>32 \mu\text{g/mL}$ olarak belirlenmiştir. Birçok çalışmada, NDM pozitif izolatların, beta laktamlar dışında aminoglikozitler, kinolonlar gibi diğer antimikrobiyal ilaç gruplarına karşı da dirençli olduğu gösterilmiştir. Bu durum, NDM pozitif izolatların AmpC beta laktamazlar, GSBL, farklı karbapenemazlar, aminoglikozit direnç genleri ve kinolon direnç genlerini de taşımalarına bağlanabilir (155, 167-170). Bizim çalışmamızda bulunan izolat ise, test edilen aminoglikozitler, kinolonlar ve kolistine direnç göstermemektedir. Plazmit aracılı kinolon direnç genlerinden *qnrS*'yi taşımaktadır. Bu genlerin varlığında da kinolon MİK değerlerinin duyarlılık sınır değerleri içerisinde kalabildiği bilinmektedir. Türkiye'de NDM pozitif *K. pneumoniae* salgını 2014-2015 yıllarında Sakarya'da sekiz erişkin yoğun bakım hastasında gösterilmiş ve bu izolatların tamamı tedavide kullanılabilecek alternatif ilaçlardan, amikasin, gentamisin, siprofloksasin ve kolistine de dirençli bulunmuştur (171). Çalışmamızda bir izolat KPC üreten *K. pneumoniae* olarak tanımlanmıştır. Bu izolat, karbapenemler ve kinolonlara dirençliyen, aminoglikozitler ve kolistine duyarlıdır. Türkiye'de KPC üreten *K. pneumoniae* izolatları ilk olarak 2012'de Romanya'dan gelen bir hastada gösterilmiş ve günümüze kadar nadiren izole edilmeye devam etmiştir (88, 152, 154, 172-174).

K. pneumoniae kor genomunda genellikle taşıdığı *bla*_{SHV-1} beta-laktamaz sayesinde ampisiline direnç göstermektedir. Ünlü ve ark. çalışmasında karbapenem dirençli 22 izolatın %95,45’inde *bla*_{CTX-M-1}, %86,36’sında *bla*_{TEM-1} gösterilmiştir (175). Iraz ve ark. araştırmasında ise karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının tamamında CTX-M, %97’sinde SHV ve %9’unda TEM beta laktamaz gösterilmiştir (176). Tekeli ve ark. çalışmasında KPC ve NDM karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarının tamamında SHV ve CTX-M beta-laktamaz bulunurken, TEM beta-laktamaz negatif saptanmıştır (152). Tian ve ark. tarafından yapılan çalışmada 170 karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’de, en yüksek prevalansa sahip GSBL genleri *bla*_{TEM-1} (%90,59), *bla*_{CTX-M-15} (%68,24), *bla*_{SHV-1} (%58,26), *bla*_{SHV-11} (%30,59), *bla*_{CTX-M-14} (%14,12), *bla*_{SHV-12} (%7,65) ve *bla*_{SHV-5} (%0,59) olarak gösterilmiştir. İzolatların %95,88’inin birden fazla GSBL geni taşıdığı gösterilmiştir (139). Çalışmamızda tüm izolatlarımızda *bla*_{SHV} gösterilmiştir. Ek olarak, *bla*_{CTX-M} %86,11 ve *bla*_{TEM} oranı %52,78 bulunmuştur. Örneklerimizin %86,11’inde birden fazla GSBL bulunmaktadır.

Aktarılabılır AmpC beta-laktamaz enzimlerinden dünyada en sık *Citrobacter freundii* kaynaklı CMY-2 saptanmaktadır (51). Ülkemizde, karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında AmpC varlığına dair Gülmez ve ark. tarafından yapılan tek çalışmada OXA-48 karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında, AmpC beta-laktamaz genlerine rastlanmamıştır (177). Tian ve ark. tarafından yapılan çalışmada karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’de DHA-1 izolatların %4,12’sinde gösterilirken, CMY-6 %1,18’inde gösterilmiştir (139). Çalışmamızda, yalnızca iki izolatta (%5,56) CIT grubu AmpC beta laktamaz saptanmıştır. Pitart ve ark. çalışmasında OXA-48 taşıyan sefoksitin dirençli izolatlarda OmpK36 kaybının sefoksitin ve yüksek düzey karbapenem direncinden sorumlu olduğunu göstermiştir (178). Sefoksitin dirençli izolatlarımızın 22’sinde PZR ile AmpC beta laktamaz gösterilmemiştir. Bu durum, sefoksitin direncinin beta laktamaz üretimi dışındaki mekanizmalara bağlı olabileceğini düşündürmüştür. Matsumura ve ark. karaciğer transplantasyon ünitesinde, DHA ve CMY tipi AmpC beta laktamaz üreten ve porin kaybı ile karbapeneme direnç gösteren *K. pneumoniae* izolatlarının yol açtığı salgını raporlamıştır (179).

Aminoglikozitler özellikle çoklu ilaç dirençli bakteri enfeksiyonlarına karşı kombinasyon tedavisinde kullanılmaktadır. Yüksek düzey aminoglikozit direnci gelişiminden sorumlu ve aktarılabılır 16S rRNA metiltransferaz üreten *K. pneumoniae* 2003’te Fransa’da raporlanmış ardından dünyanın birçok bölgesinden bildirilmiştir. Bu genlerin prevalansı düşük olsa da karbapenemaz ve GSBL genlerini taşıyan plazmitlerle taşındıklarından global olarak yayılmaktadırlar (180). Çalışmamızda bu genlerden, 3 (%8,33) izolatta *armA*, 2 izolatta

(%5,56) *rmtC* saptanırken, *rmtB* veya *rmtF* pozitif izolat görülmemiştir. *armA* ve *rmtC* saptanan izolatların aminoglikozit MİK değerleri >256 µg/mL bulunmuştur. Bu izolatlar OXA-48 benzeri karbapenemaz geni taşımaktadır. Yiş ve ark. İzmir’de 2014 yılında izole edilmiş 32 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatında 16S rRNA metiltransferaz saptamazken, 2015 yılında izole edilmiş 35 izolatın 28’inde Türkiye’de ilk kez *armA* pozitifliği göstermiştir. Bu izolatların 5’i *bla*_{OXA-48}, 17’si *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{NDM}’yi birlikte taşıırken, 6’sı ise *bla*_{NDM} pozitif olarak raporlanmıştır (181). Gökmen ve ark. çalışmasında ise yüksek düzey amikasin (MİK >512 µg/mL) ve gentamisin (MİK>128 µg/mL) direnci gösteren beş izolatın dördünde *rmtC* varlığı gösterilmiş, bunların birinde NDM, birinde OXA-48 ve ikisinde NDM-1 ve OXA-48 karbapenemaz genleri gösterilmiştir (182). Tekeli ve ark. çalışmasında KPC ve NDM karbapenemaz üreten on *K. pneumoniae* izolatının tamamında *rmtC* geni gösterilmiştir, bu çalışmada amikasin ve gentamisin MİK değerleri >256 µg/mL olarak bulunmuştur (152). Suudi Arabistan’da *rmtB*, *rmtC* ve *armA* genlerinin aynı izolatta birlikteliği gösterilirken bizim çalışmamızda gen birlikteliğine rastlanmamıştır (183). *rmtF* geni, Nepal, Amerika Birleşik Devletleri, Hindistan ve İngiltere’de gösterilmiştir (184). Bu gen, Türkiye’de bir *bla*_{OXA-48} pozitif *K. pneumoniae* izolatında bulunmuştur (185). *rmtB* geni de, Türkiye’de aminoglikozit dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında gösterilmiştir (186).

PAKD genleri, plazmitle aktarılabilmeleri nedeniyle önemlidir ancak tek başlarına kinolon direncine neden olmaları beklenmemektedir. Kinolon direncinde özellikle kromozomal mutasyonlar rol almaktadır. Çalışmamızda PAKD genlerinden, *qnrB* 19 (%52,78) izolatta tek başına pozitif saptanmıştır, bu izolatların 18’i (%94,73) siprofloksasine, sekizi (%47,36) levofloksasine dirençlidir. *qnrS* 6 (%16,67) izolatta tek başına pozitif bulunmuştur, bunların dördü (%66,66) siprofloksasine ve levofloksasine dirençlidir. *qnrB* ve *qnrS* birlikteliği görülen 2 (%5,56) izolatta da her iki florokinolon dirençli saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *qnrA*, *qnrC* ve *qepA* saptanmamıştır. Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’de PAKD varlığına ilişkin çalışma ülkemizde az sayıdadır. Ünlü ve ark. çalışmasında, karbapenem dirençli *K. pneumoniae*’de *qnrB*’yi izolatların %77,27’sinde, *qnrS*’yi %86,36’sında pozitif bulmuştur (175). Çalışmamızda daha düşük oranlarımızın bulunmasının izolatlarımızın elde edildiği grubun çocuk hastalar olmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Zhan ve ark. çalışmasında ise, *qnrS* izolatların %43’ünde, *qnrB* %10’unda gösterilirken, Al-Agamy ve ark. çalışmasında *qnrS* izolatların %58,1’inde, *qnrB* %3,2’sinde gösterilmiştir (187, 188).

Aktarılabılır kolistin direnci genlerinden dünyada en sık *mcr-1* görülmektedir. Türkiye’de yakın zamanda Arabacı ve ark. ile Hazırolan ve ark. tarafından *mcr-1* pozitif karbapenem ve

kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının varlığı gösterilmiştir ancak bizim çalışmamızda saptanmamıştır (189, 190).

Kromozomal *mgrB* geninde mutasyonlar da kolistin dirençli izolatlarda görülmektedir (143, 191). Bazı çalışmalarda, kromozomal mutasyonların kolistin direnci gelişiminde *mcr* genlerinden daha önemli bir rolü olduğu öne sürülmektedir (192-194) Türkiye’de kolistin tedavisi almakta olan bir hastada ilk kez 2014 yılında *mgrB* mutasyonu ile kolistin direnci gelişimi gösterilmiştir (85). Pakistan’dan izole edilmiş yedi izolatta kolistin direnç mekanizmalarından *mcr* genleri görülmezken bir izolatta *mgrB* delesyonu, üç izolatta *mgrB* dizisinin katılım dizisi ile kesintiye uğraması ve *mgrB* değişiklikliklerine eşlik eden *pmrB* değişiklikleri ve *mgrB* yapısı bozulmamış olan üç izolatta da *pmrB* aminoasit değişiklikleri gösterilmiştir (195). İzolatlarımızda, *mgrB* dizisinde nükleotit delesyonu (A7 delesyonu), nükleotit değişimleri (A7T, T83G, C88T, A121G) ya da diziye katılım dizisi yerleşmesiyle *mgrB* proteininin yapısını bozan mutasyonlar gösterilmiştir. Bu değişimler sonucunda vahşi tip diziden uzun ya da kısa, fonksiyonsuz proteinler oluşmuştur. Nükleotit dizisinde A7T değişimiyle oluşan ve proteinin erken sonlanmasına neden olan mutasyon ve katılım dizilerinin yerleşmesi ile dizinin kesintiye uğraması Cannatelli ve ark.’nın çalışmasında *mgrB* dizisinde gösterilmiş mutasyonlardır (81). A7T nükleotit değişimi, Shein ve ark. tarafından bir izolatta da gösterilmiştir (196). Proteinin erken sonlanması ile sonuçlanan C88T değişimi farklı çalışmalarda gösterilmiştir (197-199). Jaidane ve ark. da nükleotit dizisinde T83G değişimini tanımlamış ve bu değişimin kolistin MİK değerinde 8-16 kat artışa neden olduğunu bulmuştur (200). Bu nedenle, çalışmamızda saptanan *mgrB* mutasyonları bu izolatlardaki kolistin direnci ile ilişkilendirilmiştir. Çalışmamızda saptanmış olan A7 delesyonu ve A121G nükleotit değişimi literatürde bulunmamaktadır. Ancak, A7 delesyonunun, proteinin erken sonlanmasına yol açması ve A121G nükleotit değişimine T83G değişiminin de eşlik etmesi nedeniyle bu iki izolatta da *mgrB* geni fonksiyonu ortadan kalkmıştır. Lipopolisakkarit değişikliklerine neden olan diğer gen mutasyonları değerlendirilmemiştir, izolatlarda *mgrB* değişiklikliklerine eşlik eden başka gen mutasyonlarının bulunması da muhtemeldir.

Çalışmamızda kolistine dirençli bulunan ST14, ST17, ST37, ST101, ST147, ST661 ve ST2096 izolatları farklı çalışmalarda da gösterilmiştir (201-206). Ancak kolistin dirençli ST985 izolatına diğer çalışmalarda rastlanmamıştır.

K. pneumoniae’nin polisakkarit kapsülü majör bir virülans belirleyicisi ve epidemiyolojik belirteçtir. Çalışmamızda en sık saptanmış olan kapsüller tipler K2 ve K14.K64’tür. Her iki

kapsüler tip de, birçok sekans tipinde saptanmaktadır ve hipervirölans ile ilişkilendirilmiştir (26, 207-209) .

Klebsiella pneumoniae izolatlarının genetik çeşitliliği birçok çalışmada gösterilmiştir. Wyres ve ark. tarafından karbapenem dirençli *K. pneumoniae* klonları değerlendirildiğinde, ST 258 ve türevi ST 512'nin Amerika kıtası ve Güney Avrupa'da en yaygın sekans tipleri olduğu, ST 11'in ise Avrupa genelinde daha yaygın olduğu ve Çin'de baskın klon olduğu gösterilmiş, CG 307'nin, ST 258 ve ST512'nin yerini almaya başladığı, CG 15'in (ST 14 ve ST 15) ise, üçüncü kuşak sefalosporin dirençli klonlar arasında en sık görülen klon olduğu ve karbapenem dirençli varyantlarının da raporlandığı belirtilmiştir (3).

Çalışmamızda ST14 (n=18) en yüksek oranda saptanan tip olmuştur. ST14, çoklu ilaç dirençli ve OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten *K. pneumoniae*'nin klonal yayılımı ile ilişkilendirilen yüksek riskli bir klondur (210, 211). ST14 ve NDM üretimi Hindistan, Birleşik Krallık ve İsveç'ten, OXA-48 ve NDM üretimi ise ABD'den bildirilmiştir (212, 213). Kim ve ark.'nın çalışmasında ST14 OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatlar sefalosporinlere dirençliken ertapeneme değişken sonuçlar göstermiştir (214) . Bizim çalışmamızda bir izolat ertapeneme duyarlıken; imipenem, meropenem ve diğer antimikrobiyallere duyarlılıkları değişkenlik göstermektedir. Hepsinde *bla*_{SHV} bulunurken, bir izolat dışında (%94,44) *bla*_{CTX-M} taşıdıkları, 11 (%61,11) izolatta *bla*_{TEM}, 14 izolatta (%77,78) *qnrB* bulunduğu gösterilmiştir. Garcia-Fulgueiras ve ark. çalışmasında *qnrB* genlerinin varlığı ile ST14 sekans tipi arasında doğrudan ilişki bulmuştur (215). 16S rRNA metiltransferazlar, ST14 gibi yüksek riskli klonlarda sıklıkla bulunmaktadır, İşler ve ark. karbapenemaz üreten ST14 *K. pneumoniae* izolatlarında *armA* ve *rmtC* varlığını gösterirken bizim çalışmamızda 16S rRNA metiltransferaz genleri saptanmamıştır (216). Moubareck ve ark. karbapenem dirençli ST14 izolatlarında kolistin direncini %31,4 olarak gösterirken bu çalışmada bir izolatta kolistin direnci saptanmıştır (217). Bu izolatta T83G nükleotit değişimi gösterilirken, Shankar ve ark. çalışmasında ST14 kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında *mgrB* dizisinin katılımı dizisiyle kesintiye uğraması, dizinin delesyonu ya da nükleotit mutasyonları ile kolistin direnci gelişimini göstermiştir (203). Bu sekans tipi, K16 ve K2 kapsül tipleri ile ilişkilendirilmiştir, bizim çalışmamızda K2 kapsül tipi gösterilmiştir (212, 218).

Çalışmamızda, üç izolatta saptadığımız ST2096'nın dünyada farklı çalışmalarda antimikrobiyal direnç genlerini ve artmış virölans özelliklerini bir arada taşıdığı gösterilmiştir (219, 220). Ülkemizde karbapenem ve kolistin dirençli ST2096 salgını Hoşbul ve ark.

tarafından raporlanmıştır (203). İşler ve ark. bu klonun sıklıkla *bla*_{OXA-48} benzeri taşıdığını ve sıklıkla kolistin direnci gösterdiğini belirtmiştir (221). Çalışmamızda, bu izolatlar karbapenemler, aminoglikozitler ve kinolonlara dirençli iken, bir izolat kolistine duyarlıdır. İzolatlarımızda *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz geninin yanında *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} saptanmıştır. İki (%66,66) izolat *bla*_{TEM} geni taşımaktadır. Tümünde *armA* 16 S rRNA metiltransferaz geni gösterilmiştir. İzolatların birinde (%33,33) *qnrS* geni saptanmıştır, literatürde ST2096'da PAKD genlerinin varlığına rastlanmamıştır. Kolistin dirençli izolatlarımızın *mgrB* dizisinde, T83G ve C88T değişimleri bulunmuştur. *wzi* allel 64 ve hipervirülans ile ilişkilendirilmiş olan kapsüler tip K14.K64 izolatlarımızda saptanmıştır.

ST661, dünyada klinik izolatlarda nadiren saptanan bir klondur, İngiltere'de KPC üreten izolatlar ile ortaya çıkmış bir salgın raporlanmıştır. Bu salgın izolatlarının aynı zamanda *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, CIT grubu AmpC beta-laktamaz ve *qnrB* taşıyabildiği saptanmış, *mgrB* mutasyonu ile protein dizisinde N42D değişimi ile kolistin direnci kazanabildiği görülmüştür (222). Portekizde'de karbapenem dirençli ST661 suşları hastane izolatlarında gösterilirken, Brezilya'da çevresel su izolatlarında bulunmuştur (223, 224). Çalışmamızda; kan, trakeal aspirat ve kateter ucu örneklerinden izole edilen üç izolat ST661 olarak belirlenmiştir, bu sekans tipi Türkiye'de ilk kez gösterilmiştir. Çalışmamızda bulunan iki izolat, karbapenemler, florokinolonlar ve aminoglikozitlere direnç göstermekte iken, kolistine duyarlı bulunmuştur. Bu izolatlarımız, *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz, *bla*_{SHV} ve CIT grubu AmpC beta laktamaz geni, *rmtC* 16S rRNA metiltransferaz, *qnrB* ve *qnrS* taşımaktadır. *wzi* allelleri 373 bulunmuştur ve bu allelin ilişkili olduğu kapsüler tip ilgili veri tabanında bulunmamaktadır. Diğer bir izolat ise, karbapenemlere ve kolistine dirençliyken, kinolonlara ve gentamisine duyarlıdır, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} ve *qnrS* taşımaktadır. *mgrB* protein dizisinde ise F28C değişimi bulunmaktadır, *wzi* allel 211 ile ilişkilendirilmiştir.

ST147 ise ilk olarak Macaristan'da tanımlanmış yeni bir yüksek riskli klondur (225). Hindistan, İtalya, Yunanistan ve bazı Kuzey Afrika ülkelerinde endemiktir, 2000'li yıllarda kromozomal mutasyonlar ile kinolon direnci göstermeleri ve üzerinde *bla*_{CTX-M-15} taşıyan plazmit kazanmaları yayılımlarını kolaylaştırmış, ardından karbapenemaz içeren plazmitleri de kazanarak önemli bir patojen haline gelmiştir (226). ST147, VIM, KPC, NDM, OXA-48 benzeri karbapenemazlar ile ilişkilendirilmiştir (227, 228). Çalışmamızdaki iki ST147 izolatı da karbapenemler, florokinolonlar ve kolistine dirençlidir, CTX-M beta laktamaza ve OXA-48 karbapenemaza sahiptir. Bir izolat, PAKD genlerinden *qnrB*'yi taşıırken diğeri *qnrS* taşımaktadır, her iki izolat yüksek MİK değerlerine sahip olduğundan kinolon direncinin

kromozomal mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkabileceği düşünülmüştür. Her iki izolatta, *mgrB* değişikliklerinden T83G görülürken, bir izolatta ek olarak A7T nükleotit değişikliği, diğerinde ise A7 delesyonu da bulunmaktadır. Farklı *mgrB* değişiklikleri ile ortaya çıkan ST147 izolatları farklı çalışmalarda gösterilmiştir (200, 229, 230). ST 147 izolatlarının K lokusu farklı *wzi* allelleriyle ilişkilendirilirken en sık bu çalışmada da olduğu gibi *wzi* 64 (K14.K64) ile ilişkilendirilmiştir (231).

ST985 olarak belirlenen iki izolat, trakeal aspirat ve kan örneğinden elde edilmiştir, değişken antimikrobiyal duyarlılık sonuçlarına sahiptirler, bir tanesi kolistine dirençlidir. Bu izolatlardan bir tanesi *bla*_{OXA-48} benzeri karbapenemaz geninin yanında *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} taşımaktayken diğer izolatta karbapenemaz geni bulunmamakta, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} beta-laktamaz genlerini taşımaktadır. Her ikisinde de *qnrB* geni saptanmıştır. Kolistine dirençli olan izolatın *mgrB* geninde de nükleotit delesyonu ve tek nükleotit değişimi bulunmaktadır. *wzi* 37 alleli de taşıyan izolat, kapsüler tip K37 ile ilişkilendirilmiştir. ST985, Avusturya’da nehir suyundan ve bir çocuk hastadan idrar yolu etkeni olarak izole edilmiştir, bu izolatın *bla*_{SHV-83}, *bla*_{OXA-10} GSBL, *bla*_{VIM} karbapenemaz ve *qnrB* taşıdığı gösterilmiştir (232). Tunus’ta bir hastada *bla*_{OXA-48} taşıyan izolat gösterilirken, Frenk ve ark. ise bu klonu İsrail’de bir yenidoğan yoğun bakım ünitesinde GSBL üreten salgın izolatı olarak saptamıştır (233, 234). BIGSdb-Pasteur veritabanında ülkemizden bir kan izolatında bu klon gösterilmiştir (116). Literatürde kolistine dirençli ST985 izolatı raporlanmamıştır.

ST37 olarak belirlenen izolat, OXA-48 karbapenemaz üretmekte, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} taşımakta, levofloksasin ve amikasin duyarlıyken kolistine dirençlidir. Türkiye’de yapılan çalışmalarda bu sekans tipine rastlanmamıştır. Çin’de yapılmış iki çalışmada yenidoğan ünitelerinde salgın oluşturduğu gösterilmiştir (235, 236). NDM, KPC karbapenemaz ve DHA grubu AmpC beta-laktamaz üreten izolatları raporlanmıştır (235-237).

ST152 olarak tanımlanan izolat, karbapenemlere duyarlıyken siprofloksasin, gentamisin ve tobramisine dirençlidir. *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *qnrB* taşımaktadır. Ülkemizde bu sekans tipi literatürde gösterilmemiştir. ST152 klonu özellikle NDM karbapenemaz üretimi ile ilişkilendirilmiştir, GSBL, *rmtC* ve *qnrB* birlikteliği gösterilmiştir (188). Güney Afrika, Suudi Arabistan ve Polonya’da izolatları saptanmıştır (238-240).

ST101 olarak tanımlanan izolat, OXA-48 karbapenemaz üretmekte, *bla*_{CTX-M} ve *qnrS* taşımaktadır. Karbapenemler, kinolonlar, aminoglikozitler ve kolistine dirençli olarak saptanmıştır. ST101 klonu, yüksek riskli epidemik bir klonudur ve CTX-M, NDM ve OXA-48

ile ilişkilendirilmiştir (243). OXA-48 karbapenemaz üreten ST101 klonları Türkiye, İspanya ve Tunus'ta tanımlanmıştır (178, 192, 242). Bu klonla ilişkili kolistin direnci de ilk olarak İtalya ve Sırbistan'da gösterilmiştir (192, 201). ST101, OXA-48 ve kolistin direnci arasında belirgin bir ilişki görülmektedir, Can ve ark.'nın çalışmasında kolistin dirençli ST101 izolatlarının %94'ünün *mgrB* genine katılım dizisi yerleşmesi ya da nokta mutasyonu ile direnç kazandığı gösterilmiştir (192). Çalışmamızda yer alan izolatın *mgrB* dizisinde T83G ve A121G nokta mutasyonları bulunmuştur.

ST17 klonu da bir küresel sorun klonudur. Türkiye'de daha önce varlığı saptanmamıştır. Norveç'te yenidoğan yoğun bakımda çoklu ilaç dirençli ST17 *K. pneumoniae* salgını görülmüştür. Bu salgın izolatlarının KPC, NDM, OXA-48 ve VIM tipi karbapenemaz üretebildiği, GSBL genlerini taşıyabildiği belirlenmiştir (243). Portekiz'de üçüncü basamak bir hastanede en yaygın klonlardan olduğu, OXA-48 benzeri veya KPC üreten izolatları bulunduğu ve KL25 kapsül tipi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (223). Brezilya'da OXA-370 karbapenemaz ve CTX-M beta-laktamaz, Çin'de NDM karbapenemaz üreten izolatları gösterilmiştir (244, 245). Leung ve ark. *mgrB* geni mutasyonuna bağlı kolistin direnci gelişimini raporlamışlardır (246). Çalışmamızda yer alan izolat, karbapenemlere ve kinolonlara duyarlıyken, aminoglikozitler ve kolistine dirençlidir. *bla*_{OXA-48}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{TEM} taşımaktadır. Kolistin direnci mekanizması, *mgrB*'ye IS1 katılım dizisi eklenmesi olarak belirlenmiştir.

Çalışmamızda bir izolat ST307 olarak tanımlanmıştır. Bu izolat, KPC tipi karbapenemaz ve *qnrB* genini taşımaktadır, karbapenemlere ve kinolonlara dirençli, aminoglikozitler ve kolistine duyarlıdır. İlk klinik ST307 suşları, ABD ve Pakistan'dan bildirilmiş, sonrasında dünyanın farklı bölgelerinde raporlanmaya devam etmiştir (247, 248). Özellikle, KPC ve CTX-M-15 genlerini taşıyan suşların yayılımı gösterilmiştir (249). KPC taşıyan suşların yanı sıra OXA-48 veya NDM taşıyan suşlar ve kolistin direnci de bu sekans tipinde gösterilmiştir (201, 250). Diğer klonların aksine, tüm ST307 suşları *wzi* allel 173 taşımakta ve KL102 kapsül tip ile ilişkilendirilmektedir, bizim çalışmamızda da *wzi* allel 173 taşıdığı gösterilmiştir (251). Edinilmiş çoklu ilaç direnci genleri, yüksek oranda görülmektedir. ST307, çoklu ilaç dirençli, küresel bir sorun oluşturan klondur, karbapenemazların ve klinik olarak önemli diğer direnç belirteçlerinin yayılımını sağlayabilir (226).

ST39, Cezayir'de çocuk hastanesinde *armA* metiltransferaz üreten *K. pneumoniae* salgınında saptanmış bir klondur. Aynı zamanda CTX-M, TEM, SHV beta-laktamaz ürettiği,

qnrB taşıdığı da gösterilmiştir (252). Yunanistan'da VIM ve KPC karbapenemaz taşıyan izolatları gösterilmiş ve *mgrB* geninin insersiyonel inaktivasyonu ile kolistin direnci geliştirdiği raporlanmıştır (253). Çalışmamızdaki izolat Türkiye'de saptanan ilk ST39 izolatıdır, karbapenemler, kinolonlar, kolistine ve tobramisin dışındaki aminoglikozitlere duyarlı bulunmuştur. OXA-48 benzeri karbapenemaz geni, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}* taşımaktadır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, bir yıllık sürede, çocuk hastalıkları yoğun bakım ve yenidoğan yoğun bakım ünitelerinde yatmış 34 hastanın kültür örneklerinde üreyen 36 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatının antimikrobiyal duyarlılıkları ve moleküler epidemiyolojik özellikleri değerlendirilmiştir.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında, amoksisilin klavulanat, piperasilin tazobaktam, seftaksim, seftazidim ve sefepime direnç oranı %100 bulunurken, izolatların %66,67'si sefoksitine, %86,11'i ertapeneme, %58,33'ü imipeneme, %44,44'ü meropeneme, %27,78'i amikasin, %77,78'i gentamisine, %86,11'i tobramisine, %80,56'sı siprofloksasine ve %52,78'i levofloksasine dirençli saptanmıştır. Direnç oranı en düşük antibiyotik amikasin olarak belirlenmiştir.

1. İzolatların %30,56'sında sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kolistine direnç bulunmuştur.
2. OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten izolatların tamamında karbapenem inaktivasyon yöntemi ile yapılan karbapenemaz üretimi testi pozitif bulunurken, NDM karbapenemaz genini taşıyan izolatın bu yöntem ile karbapenemaz üretimi saptanmamıştır.
3. İzolatların 33'ünde (%91,67) OXA-48 benzeri, birinde (%2,78) NDM ve birinde (%2,78) KPC karbapenemaz gösterilmiştir. Bir izolatta ise karbapenemaz geni bulunmadığı tespit edilmiş, karbapenem direncinin GSBL ve porin kaybı gibi farklı bir mekanizma ile gelişmiş olabileceği düşünülmüştür.
4. Tüm izolatlarda *bla_{SHV}* gösterilmiştir. Ek olarak, *bla_{CTX-M}* %86,11 ve *bla_{TEM}* oranı %52,78 bulunmuştur. İzolatların, %86,11'inde birden fazla GSBL bulunmaktadır. AmpC beta-laktamazlardan ise yalnızca CIT grubu 2 (%5,56) izolatta saptanmıştır.
5. Aktarılabılır 16S rRNA metiltransferaz genlerinden, 3 (%8,33) izolatta *armA*, 2 izolatta (%5,56) *rmtC* saptanırken, *rmtB* veya *rmtF* pozitif izolat görülmemiştir. *armA* ve *rmtC* saptanan izolatların aminoglikozit MİK değerleri >256 µg/mL bulunmuştur.
6. Plazmit aracılı kinolon direnç genlerinden, *qnrB* 19 (%52,78), *qnrS* 6 (%16,67), *qnrB* ve *qnrS* 2 (%5,56) izolatta pozitif saptanmıştır. İzolatların hiçbirinde *qnrA*, *qnrC* ve *qepA* saptanmamıştır. İzolatlarda kinolon direnci gelişimine neden olan kromozomal mutasyonların bulunabileceği düşünülmüştür.
7. Kolistin dirençli izolatlarda aktarılabılır kolistin direnç genleri (*mcr1-5*) bulunmamaktadır. Kolistin direncinin, *mgrB* dizisinde; nükleotit delesyonları, nükleotit

değişimleri ya da katılım dizisinin yerleşmesiyle mgrB proteininin yapısının bozulması nedeniyle ortaya çıktığı bulunmuştur. *mgrB* gen dizisinde oluşan A7 delesyonu, proteinin erken sonlanması ile fonksiyonunun kaybı ve A121G nükleotit değişimi ilk kez gösterilmiştir. Eşlik eden lipopolisakkarit sentezi ile ilişkili gen mutasyonları bulunması da olasıdır.

8. Çalışmamızda, dokuz farklı kapsül tip bulunurken, en sık saptanan kapsül tipleri aynı zamanda en yaygın bulunan ve hipervirülansla ilişkili K2 ve K14.K64 olmuştur.
9. Pulsed field jel elektroforezi ile 15 farklı patern gösterilmiş, izolatların 17'sinin (%47,22) bir paternde toplandığı bulunmuştur. Diğer bir paternde üç (%8,33) izolat yer alırken, üç paternde ikişer izolat yer almaktadır. Bu paternlerin birbiriyle ilişkisiz olduğu gösterilmiştir.
10. Multilokus sekans tiplendirme ile, 10 farklı sekans tipi belirlenmiştir. İzolatların 18'i (%50,00) ST 14 olarak tiplendirilirken, 3 (%8,33) izolat ST 2096, 3 (%8,33) izolat ST 661, ikişer izolat ST 147 ve ST985, birer (%2,78) izolat ST 37, ST 152, ST 101, ST 17, ST 307 ve ST 39 olarak bulunmuştur. ST661, ST152, ST37, ST17 ve ST39; Türkiye'de ilk kez gösterilmiştir. Kolistin dirençli ST985 izolatı ilk kez saptanmıştır.

Karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, taşıyabildiği aktarılabılır antimikrobiyal direnç genlerinin çeşitliliği ve çoklu ilaç dirençli klonlarının hızlı yayılımı nedeniyle tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Yenidoğan yoğun bakım hastaları başta olmak üzere çocuk yoğun bakım hastaları *K. pneumoniae* enfeksiyonları açısından risk altındadır. Bu enfeksiyonlardan sorumlu izolatların antimikrobiyal direnç özelliklerinin ortaya konması ve klonlarının yayılımlarının gösterilmesi; tedavi seçeneklerinin belirlenmesine, yeni tedavi stratejilerinin geliştirilmesine ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin etkin bir şekilde uygulanmasına ışık tutabilecektir.

9. KAYNAKLAR

1. Forsythe SJ, Pitout J. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Cronobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Jorgensen JH, Carroll KC, Tenover FC, Tenover FC, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 2015: 714-737.
2. The *Enterobacteriaceae*. In: Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, Schreckenberger PC, Woods GL, eds. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. ABD: Wolters Kluwer Press, 2015:213-315.
3. Wyres KL, Lam M, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*. 2020;18(6):344-59.
4. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* population genomics and antimicrobial-resistant clones. *Trends in Microbiology*. 2016;24(12):944-56.
5. De Jesus MB, Ehlers MM, Dos Santos RF, Kock MM. Understanding β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *InTechOpen: Rijeka*, 2015:51-83.
6. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M ve ark. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(5):413-31.
7. Doi Y, Wachino J-i, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: the emergence of acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2016;30(2):523-37.
8. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*. 2014;2(5):475-503.
9. Aghapour Z, Gholizadeh P, Ganbarov K, Bialvaei AZ, Mahmood SS, Tanomand A ve ark. Molecular mechanisms related to colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Infection and Drug Resistance*. 2019;12:965-75.
10. Drancourt M, Bollet C, Carta A, Rousselier P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2001;51(3):925-32.

11. Granier SA, Leflon-Guibout V, Goldstein FW, Nicolas-Chanoine M-H. Enterobacterial repetitive intergenic consensus 1R PCR assay for detection of *Raoultella* sp. isolates among strains identified as *Klebsiella oxytoca* in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(4):1740-42.
12. Rosenblueth M, Martínez L, Silva J, Martínez-Romero E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Systematic and Applied Microbiology*. 2004;27(1):27-35.
13. Li X, Zhang D, Chen F, Ma J, Dong Y, Zhang L. *Klebsiella singaporensis* sp. nov., a novel isomaltulose-producing bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2004;54(6):2131-36.
14. Xu J, Li W, Chen X, Zhou Y. *Klebsiella alba* sp. nov., a novel pesticide-tolerant bacterium from a heavily polluted environment. *The Journal of General and Applied Microbiology*. 2010;56(3):241-47.
15. Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D ve ark. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(27):E3574-81.
16. Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T ve ark. Whole-genome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. *Clinical Science and Epidemiology*. 2017;2(4):e00290-17
17. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:3000.
18. Gorrie CL, Mirčeta M, Wick RR, Edwards DJ, Thomson NR, Strugnell RA ve ark. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients. *Clinical Infectious Diseases*. 2017;65(2):208-15.
19. Conlan S, Kong HH, Segre JA. Species-level analysis of DNA sequence data from the NIH Human Microbiome Project. *PloS One*. 2012;7(10):e47075.
20. Ludden C, Moradigaravand D, Jamrozny D, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P ve ark. A one health study of the genetic relatedness of *Klebsiella pneumoniae* and their mobile elements in the East of England. *Clinical Infectious Diseases*. 2020;70(2):219-26.

21. Martin RM, Cao J, Brisse S, Passet V, Wu W, Zhao L ve ark. Molecular epidemiology of colonizing and infecting isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Clinical Science and Epidemiology. 2016;1(5):e00261-16.
22. Chung D, Lee H, Park M, Jung S-I, Chang H-H, Kim Y-S ve ark. Fecal carriage of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* ST23 strains closely related to liver abscess isolates in Koreans living in Korea. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2012;31(4):481-86.
23. Lin Y-T, Siu LK, Lin J-C, Chen T-L, Tseng C-P, Yeh K-M ve ark. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* colonizing the intestinal tract of healthy Chinese and overseas Chinese adults in Asian countries. BMC Microbiology. 2012;12(1):1-7.
24. Löhr IH, Rettedal S, Natås OB, Naseer U, Øymar K, Sundsfjord A. Long-term faecal carriage in infants and intra-household transmission of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* following a nosocomial outbreak. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2013;68(5):1043-48.
25. Reynolds J, McDonald G, Alton H, Gordon S. Pneumonia in the immunocompetent patient. The British Journal of Radiology. 2010;83(996):998-1009.
26. Russo TA, Marr CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Clinical Microbiology Reviews. 2019;32(3):e00001-19.
27. Liu Y-C, Cheng D-L, Lin C-L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. Archives of Internal Medicine. 1986;146(10):1913-16.
28. Shon AS, Bajwa RP, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. Virulence. 2013;4(2):107-18.
29. Lee HC, Chuang YC, Yu WL, Lee NY, Chang CM, Ko NY ve ark. Clinical implications of hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolates: association with invasive syndrome in patients with community-acquired bacteraemia. Journal of Internal Medicine. 2006;259(6):606-14.
30. Janda WM, Hellerman DV, Zeiger B, Brody BB. Isolation of *Klebsiella ozaenae* from a corneal abscess. American Journal of Clinical Pathology. 1985;83(5):655-57.
31. Goldstein E, Lewis R, Martin W, Edelstein P. Infections caused by *Klebsiella ozaenae*: a changing disease spectrum. Journal of Clinical Microbiology. 1978;8(4):413-18.
32. Högenauer C, Langner C, Beubler E, Lippe IT, Schicho R, Gorkiewicz G ve ark. *Klebsiella oxytoca* as a causative organism of antibiotic-associated hemorrhagic colitis. New England Journal of Medicine. 2006;355(23):2418-26.

33. Philbrick AM, Ernst ME. Amoxicillin-associated hemorrhagic colitis in the presence of *Klebsiella oxytoca*. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*. 2007;27(11):1603-7.
34. Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas M, Giske C ve ark. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012;18(3):268-81.
35. Nikaido H. Multidrug resistance in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78:119-46.
36. Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. *Journal of Medical Society*. 2018;32(1):76.
37. Pendleton JN, Gorman SP, Gilmore BF. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2013;11(3):297-308.
38. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS ve ark. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2019;19(1):56-66.
39. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2020. Stockholm; 2022.
40. TC Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Kurumu. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi 2016 Yıllık Raporu. Ankara; 2016.
41. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2017;16(1):1-12.
42. Majiduddin FK, Materon IC, Palzkill TG. Molecular analysis of beta-lactamase structure and function. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002;292(2):127-37.
43. EUCAST subcommittee for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance Version 2.0. 2017.
44. Hall BG, Barlow M. Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;55(6):1050-51.
45. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2010;54(3):969-76.

46. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*. 1995;8(4):557-84.
47. Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001;14(4):933-51.
48. Naas T, Poirel L, Nordmann P. Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14:42-52.
49. Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F ve ark. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14:144-53.
50. Gniadkowski M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14:11-32.
51. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2009;22(1):161-82.
52. Beceiro A, Bou G. Class C β -lactamases: an increasing problem worldwide. *Reviews in Medical Microbiology*. 2004;15(4):141-52.
53. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial-Agents and Chemotherapy*. 2002;46(1):1-11.
54. Tenover FC, Emery SL, Spiegel CA, Bradford PA, Eells S, Endimiani A ve ark. Identification of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Proteus* species can potentially improve reporting of cephalosporin susceptibility testing results. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009;47(2):294-99.
55. Yagi T, Wachino J-i, Kurokawa H, Suzuki S, Yamane K, Doi Y ve ark. Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(6):2551-58.
56. Halstead FD, Vanstone GL, Balakrishnan I. An evaluation of the Mast D69C AmpC Detection Disc Set for the detection of inducible and derepressed AmpC β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(9):2303-4.
57. Edquist P, Ringman M, Liljequist B, Wisell K, Giske C. Phenotypic detection of plasmid-acquired AmpC in *Escherichia coli*—evaluation of screening criteria and performance of two commercial methods for the phenotypic confirmation of AmpC production. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2013;32(9):1205-10.
58. Ingram PR, Inglis TJ, Vanzetti TR, Henderson BA, Harnett GB, Murray RJ. Comparison of methods for AmpC β -lactamase detection in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Medical Microbiology*. 2011;60(6):715-21.

59. Hansen F, Hammerum AM, Skov RL, Giske CG, Sundsfjord A, Samuelsen Ø. Evaluation of Rosco Neo-Sensitabs for phenotypic detection and subgrouping of ESBL-, AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology- APMIS journal. 2012;120(9):724-32.
60. Pérez-Pérez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology. 2002;40(6):2153-62.
61. Brolund A, Wisell KT, Edquist PJ, Elfström L, Walder M, Giske CG. Development of a real-time SYBRGreen PCR assay for rapid detection of acquired AmpC in *Enterobacteriaceae*. Journal of Microbiological Methods. 2010;82(3):229-33.
62. Vatopoulos A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece-a review of the current evidence. Eurosurveillance. 2008;13(4):7-8.
63. Albiger B, Glasner C, Struelens MJ, Grundmann H, Monnet DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assessment by national experts from 38 countries, May 2015. Eurosurveillance. 2015;20(45).
64. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerging Infectious Diseases. 2011;17(10):1791.
65. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. Clinical Microbiology Reviews. 2007;20(3):440-58.
66. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske C, Poirel L, Woodford N, Miriagou V ve ark. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clinical Microbiology and Infection. 2012;18(5):432-8.
67. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009;63(4):659-67.
68. Taylor E, Sriskandan S, Woodford N, Hopkins KL. High prevalence of 16S rRNA methyltransferases among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in the UK and Ireland. International Journal of Antimicrobial Agents. 2018;52(2):278-82.
69. Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K ve ark. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2006;56(3):305-12.

70. Bogaerts P, Galimand M, Bauraing C, Deplano A, Vanhoof R, De Mendonca R ve ark. Emergence of *armA* and *rmtB* aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007;59(3):459-64.
71. Wu Q, Zhang Y, Han L, Sun J, Ni Y. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(1):271-72.
72. Martínez-Martínez L, Pascual A, Jacoby GA. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*. 1998;351(9105):797-99.
73. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Hye Park C ve ark. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine*. 2006;12(1):83-88.
74. Yamane K, Wachino J-i, Suzuki S, Kimura K, Shibata N, Kato H ve ark. New plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump, *qepA*, found in an *Escherichia coli* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007;51(9):3354-60.
75. Tran JH, Jacoby GA. Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(8):5638-42.
76. Xue G, Li J, Feng Y, Xu W, Li S, Yan C ve ark. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from pediatric patients in China. *Microbial Drug Resistance*. 2017;23(1):107-14.
77. Olaitan AO, Morand S, Rolain J-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2014;5:643.
78. Falagas ME, Rafailidis PI, Matthaïou DK. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates*. 2010;13(4-5):132-38.
79. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(5):2780-84.
80. Cheng YH, Lin TL, Lin YT, Wang JT. Amino acid substitutions of CrrB responsible for resistance to colistin through CrrC in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(6):3709-16.
81. Cannatelli A, Giani T, D'Andrea MM, Di Pilato V, Arena F, Conte V ve ark. *mgrB* inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(10):5696-703.
82. Lippa AM, Goulian M. Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genetics*. 2009;5(12):e1000788.

83. Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, Di Pilato V, Arena F, Ambretti S ve ark. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(11):5521-26.
84. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(6):1038.
85. Poirel L, Jayol A, Bontron S, Villegas M-V, Ozdamar M, Türkoglu S ve ark. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015;70(1):75-80.
86. Olaitan AO, Diene SM, Kempf M, Berrazeg M, Bakour S, Gupta SK ve ark. Worldwide emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* from healthy humans and patients in Lao PDR, Thailand, Israel, Nigeria and France owing to inactivation of the PhoP/PhoQ regulator *mgrB*: an epidemiological and molecular study. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2014;44(6):500-7.
87. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J ve ark. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*. 2016;16(2):161-68.
88. Labarca J, Poirel L, Özdamar M, Turkoglu S, Hakko E, Nordmann P. KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, finally targeting Turkey. *New Microbes and New Infections*. 2014;2(2):50-51.
89. March C, Cano V, Moranta D, Llobet E, Pérez-Gutiérrez C, Tomás JM ve ark. Role of bacterial surface structures on the interaction of *Klebsiella pneumoniae* with phagocytes. *PloS One*. 2013;8(2):e56847.
90. Cortés G, Borrell N, de Astorza B, Gómez C, Saulea J, Albertí S. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a murine model of pneumonia. *Infection and Immunity*. 2002;70(5):2583-90.
91. Lawlor MS, Hsu J, Rick PD, Miller VL. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. *Molecular Microbiology*. 2005;58(4):1054-73.
92. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompert CM, Alberti S, and Bengoechea, JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infection and Immunity*. 2004;72:7107-14.

93. Merino S, Camprubí S, Albertí S, Benedí V-J, Tomas J. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. *Infection and Immunity*. 1992;60(6):2529-35.
94. Evrard B, Balestrino D, Dosgilbert A, Bouya-Gachancard J-L, Charbonnel N, Forestier C ve ark. Roles of capsule and lipopolysaccharide O antigen in interactions of human monocyte-derived dendritic cells and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 2010;78(1):210-9.
95. Lee CH, Chang CC, Liu JW, Chen RF, Yang KD. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. *Virulence*. 2014;5(6):673-9.
96. Ørskov I, Fife-Asbury MA. New *Klebsiella* capsular antigen, K82, and the deletion of five of those previously assigned. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 1977;27(4):386-87.
97. Edwards PR, Fife MA. Capsule types of *Klebsiella*. *The Journal of Infectious Diseases*. 1952;91(1):92-104.
98. Edmunds P. Further *Klebsiella* capsule types. *The Journal of Infectious Diseases*. 1954;94(1):65-71.
99. Jenney AW, Clements A, Farn JL, Wijburg OL, McGlinchey A, Spelman DW ve ark. Seroepidemiology of *Klebsiella pneumoniae* in an Australian Tertiary Hospital and its implications for vaccine development. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(1):102-7.
100. Tsay RW, Siu L, Fung CP, Chang FY. Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection: risk factor for mortality and the impact of capsular serotypes as a herald for community-acquired infection. *Archives of Internal Medicine*. 2002;162(9):1021-27.
101. Pan YJ, Lin TL, Chen CT, Chen YY, Hsieh PF, Hsu CR ve ark. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp. *Scientific Reports*. 2015;5:15573.
102. Wyres KL, Gorrie C, Edwards DJ, Wertheim HF, Hsu LY, Van Kinh N ve ark. Extensive capsule locus variation and large-scale genomic recombination within the *Klebsiella pneumoniae* clonal group 258. *Genome Biology and Evolution*. 2015;7(5):1267-79.
103. Brisse S, Issenhuth-Jeanjean S, Grimont PA. Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(8):3388-98.

104. Brisse S, Passet V, Haugaard AB, Babosan A, Kassis-Chikhani N, Struve C ve ark. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 2013;51(12):4073-78.
105. Pan YJ, Lin TL, Chen YH, Hsu CR, Hsieh PF, Wu MC. Capsular types of *Klebsiella pneumoniae* revisited by *wzc* sequencing. *PloS One*. 2013;8(12):e80670.
106. Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard A-S ve ark. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerging Infectious Diseases*. 2014;20(11):1812.
107. Bowers JR, Lemmer D, Sahl JW, Pearson T, Driebe EM, Engelthaler DM ve ark. KlebSeq: A Diagnostic Tool for Healthcare Surveillance and Antimicrobial Resistance Monitoring of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2016;54(10):2582-96.
108. Zhou K, Lokate M, Deurenberg RH, Tepper M, Arends JP, Raangs EG ve ark. Use of whole-genome sequencing to trace, control and characterize the regional expansion of extended-spectrum β -lactamase producing ST15 *Klebsiella pneumoniae*. *Scientific Reports*. 2016;6:20840.
109. Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR ve ark. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial Genomics*. 2016;2(12):e000102.
110. Durmaz R. Moleküler Epidemiyoloji Neden Gerekli, Yöntemlerdeki Gelişmeler Nelerdir? In: Durmaz R, Eser Ö, Otlı B, eds. *Moleküler Mikrobiyoloji Tanı ve Epidemiyoloji*. Ankara: Akademisyen Kitabevi, 2022;271-284.
111. Ranjbar R, Karami A, Farshad S, Giammanco GM, Mammina C. Typing methods used in the molecular epidemiology of microbial pathogens: a how-to guide. *New Microbiologica*. 2014;37(1):1-15.
112. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH ve ark. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 1995;33(9):2233-39.
113. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(8):4178-82.

114. Ribot EM, Fair M, Gautom R, Cameron D, Hunter S, Swaminathan B ve ark. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157: H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. Foodborne Pathogens & Disease. 2006;3(1):59-67.
115. Enright MC, Spratt BG. Multilocus sequence typing. Trends in Microbiology. 1999;7(12):482-87.
116. Jolley KA, Chan M-S, Maiden MC. mlstdbNet–distributed multi-locus sequence typing (MLST) databases. BMC Bioinformatics. 2004;5:86.
117. Feil EJ, Li BC, Aanensen DM, Hanage WP, Spratt BG. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. Journal of Bacteriology. 2004;186(5):1518-30.
118. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters Version 12.0. 2022.
119. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing Version 10.0. 2022.
120. Yamada K, Kashiwa M, Arai K, Nagano N, Saito R. Comparison of the Modified-Hodge test, Carba NP test, and carbapenem inactivation method as screening methods for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Journal of Microbiological Methods. 2016;128:48-51.
121. Tasli H, Bahar IH. Molecular characterization of TEM-and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2005;58(3):162.
122. Bonnet R, Recule C, Baraduc R, Chanal C, Sirot D, De Champs C ve ark. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(1):29-35.
123. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2011;70(1):119-23.
124. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clinical Infectious Diseases. 2007;45(1):88-94.
125. Jacoby GA, Gacharna N, Black TA, Miller GH, Hooper DC. Temporal appearance of plasmid-mediated quinolone resistance genes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2009;53(4):1665-66.

126. Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim E-C, Jacoby GA, Hooper DC. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2009;53(2):639-45.
127. Jousset AB, Bernabeu S, Bonnin RA, Creton E, Cotellon G, Sauvadet A ve ark. Development and validation of a multiplex polymerase chain reaction assay for detection of the five families of plasmid-encoded colistin resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;53(3):302-9.
128. National Library of Medicine. Basic Local Alignment Search Tool n.d. Available from: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
129. Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Pruitt KD, Schoch CL, Sherry ST ve ark. GenBank. *Nucleic Acids Research*. 2021;49(D1):D92-D6.
130. Jolley KA, Maiden MC. BIGSdb: scalable analysis of bacterial genome variation at the population level. *BMC Bioinformatics*. 2010;11(1):1-11.
131. Graves LM, Swaminathan B. PulseNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by macrorestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 2001;65(1-2):55-62.
132. Us E, Tekeli A, Dolapci I, Sahin F, Karahan Z. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated between 2004-2007 in Ankara University Hospital, Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2010;44(1):1-10.
133. Reif H, Saedler H. IS1 is involved in deletion formation in the gal region of *E. coli* K12. *Molecular and General Genetics MGG*. 1975;137(1):17-28.
134. Logan LK. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging problem in children. *Clinical Infectious Diseases*. 2012;55(6):852-59.
135. Alp E, Percin D, Colakoğlu S, Durmaz S, Kürkcü C, Ekincioğlu P ve ark. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. *Journal of Hospital Infection*. 2013;84(2):178-80.
136. Lutgring JD, ed. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: an emerging bacterial threat. *Seminars in Diagnostic Pathology*; 2019: Elsevier.
137. Dursun A, Özsoylu S, Kılıç H, Kılıç AU, Akyıldız BN. Çocuk yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları. *Turkish Journal of Intensive Care*. 2018;16(3):306-311.
138. Öztaş S, Er DK, Dünder D. Karbapenemlere dirençli ve duyarlı *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının çeşitli antimikrobiyallere direnç oranları. *Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*. YIL;8(3):229-32.

139. Tian D, Pan F, Wang C, Sun Y, Zhang H. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11:1935.
140. Özkul Koçak C, Hazırolan G. Karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında kolistin direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2019;49(1):17-23.
141. Çaycı YT, Bıyık İ, Çınar C, Birinci A. Karbapeneme dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarının 2015-2018 yılları arasındaki antibiyotik direnci. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2020;50(3):134-40.
142. Aygar İS. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde yıllar içerisinde kolistin MİK değerindeki artışın in vitro değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2020;50(3):164-71.
143. Malchione MD, Torres LM, Hartley DM, Koch M, Goodman JL. Carbapenem and colistin resistance in *Enterobacteriaceae* in Southeast Asia: review and mapping of emerging and overlapping challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;54(4):381-99.
144. Hamel M, Chatzipanagiotou S, Hadjadj L, Petinaki E, Papagianni S, Charalampaki N ve ark. Inactivation of *mgrB* gene regulator and resistance to colistin is becoming endemic in carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in Greece: a nationwide study from 2014-2017. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2020;55(4):105930.
145. Jafari Z, Harati AA, Haeili M, Kardan-Yamchi J, Jafari S, Jabalameli F ve ark. Molecular epidemiology and drug resistance pattern of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran. *Microbial Drug Resistance*. 2019;25(3):336-43.
146. Gauthier L, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Retrospective and prospective evaluation of the carbapenem inactivation method for the detection carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *PloS one*. 2017;12(2):e0170769.
147. Tekintaş Y, Çilli F, Eraç B, Yaşar M, Aydemir S, Hoşgör Limoncu M. Klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz üretiminin saptanmasında polimeraz zincir reaksiyonu ve fenotipik yöntemlerin karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*. 2017;51(3):269-76.
148. Yıldız SS, Kaşkatepe B, Avcıküçük H, Öztürk Ş. Performance of CarbaNP and CIM tests in OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2017;64(1):9-16.
149. Lam MMC, Wick RR, Watts SC, Cerdeira LT, Wyres KL, Holt KE. Genomic surveillance framework and global population structure for *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Communications*. 2021;12: 4188.

150. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008;52(8):2950-4.
151. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(7):1597-606.
152. Tekeli A, Dolapci İ, Evren E, Oguzman E, Karahan ZC. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC and NDM-1 carbapenemases from Turkey. *Microbial Drug Resistance*. 2020;26(2):118-25.
153. Sağiroğlu P, Hasdemir U, Gelmez GA, Aksu B, Karatuna O, Söyletir G. Performance of “RESIST-3 OKN K-SeT” immunochromatographic assay for the detection of OXA-48 like, KPC, and NDM carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49:885-90.
154. Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(5):2784-5.
155. Sahin K, Tekin A, Ozdas S, Akin D, Yapislar H, Dilek AR ve ark. Evaluation of carbapenem resistance using phenotypic and genotypic techniques in *Enterobacteriaceae* isolates. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2015;14(1):1-6.
156. Parlak AU, Güdücüoğlu H, Parlak M, Bayram Y, Otlı B. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve alt türevlerinin araştırılması ve fenotipik yansıma. *ANKEM Dergisi*. 2021;35(1):1-8.
157. Okalin ŞŞ, Kaygısız ANS, Ergon MC, Öktem İMA. Karbapenem dirençli Enterobacterales izolatlarında karbapenemaz genlerinin araştırılması: Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi’nden ilk KPC bildirimi. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2021;51(4):375-81.
158. Ciftci E, Cetin ES, Us E, Kutlu HH, Arıdoğan BC. Investigation of Carbapenem resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* by using phenotypic tests and a molecular assay. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 2019;13(11):992-1000.
159. Kilic A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Annals of Laboratory Medicine*. 2015;35(3):382-83.
160. Telli M. Investigation of carbapenem resistance ratio changes and resistance genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* between 2012 to 2020. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*. 2022;52(2):95-102.

161. Haciseyitoglu D, Dokutan A, Abulaila A, Erdem F, Cag Y, Ozer S ve ark. The first *Enterobacter cloacae* co-producing NDM and OXA-48 carbapenemases and interhospital spread of OXA-48 and NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. *Clinical Laboratory*. 2017;63(7):1213-22.
162. Ece G, Tunc E, Otlu B, Aslan D, Ece C. Detection of blaOXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. *Journal of Infection and Public Health*. 2018;11(5):640-42.
163. Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J ve ark. OXA-163, an OXA-48-related class D β -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(6):2546-51.
164. Djahmi N, Dunyach-Remy C, Pantel A, Dekhil M, Sotto A, Lavigne J-P. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *BioMed Research International*. 2014;305784.
165. Tsakris A, Poulou A, Bogaerts P, Dimitroulia E, Pournaras S, Glupczynski Y. Evaluation of a new phenotypic OXA-48 disk test for differentiation of OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2015;53(4):1245-51.
166. van der Bij AK, Pitout JD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012;67(9):2090-100.
167. Wang X, Chen G, Wu X, Wang L, Cai J, Chan EW ve ark. Increased prevalence of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in hospital setting due to cross species transmission of the blaNDM-1 element and clonal spread of progenitor resistant strains. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:595.
168. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*. 2014;20(9),821-830.
169. Pollett S, Miller S, Hindler J, Uslan D, Carvalho M, Humphries R. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a health care system in Los Angeles, California, from 2011 to 2013. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014; 52(11):4003-9.
170. Baran I, Aksu N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016;15(1):1-11.

171. Karabay O, Altindis M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir ÖA, Erdem AF. The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. 2016;15(1):1-6.
172. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;28(3):1127-33.
173. Cizmeci Z, Aktas E, Otlu B, Acikgoz O, Ordekci S. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* yields increasing rates of NDM-1 carbapenemases and colistin resistance in an OXA-48 endemic area. *Journal of Chemotherapy*. 2017;29(6):344-50.
174. Cakar A, Akyon Y, Gur D, Karatuna O, Ogunc D, Baysan B ve ark. Investigation of carbapenemases in carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in 2014 in Turkey. *Mikrobiyoloji Bulteni*. 2016;50(1):21-33.
175. Unlu O, Demirci M. Detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains harboring carbapenemase, beta-lactamase and quinolone resistance genes in intensive care unit patients. *GMS Hygiene and Infection Control*. 2020;15:31.
176. Iraz M, Düzgün AÖ, Sandallı C, Doymaz MZ, Akkoyunlu Y, Saral A ve ark. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Annals of Laboratory Medicine*. 2015;35(6):595.
177. Gülmez D, Woodford N, Palepou M-FI, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y ve ark. Carbapenem resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48 like carbapenemases and outer membrane protein loss. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2008;31(6):523-6.
178. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2011;55(9):4398-401.
179. Matsumura Y, Tanaka M, Yamamoto M, Nagao M, Machida K, Ito Y ve ark. High prevalence of carbapenem resistance among plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* during outbreaks in liver transplantation units. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2015;45(1):33-40.
180. Wachino J-I, Doi Y, Arakawa Y. Aminoglycoside resistance: updates with a focus on acquired 16S ribosomal RNA methyltransferases. *Infectious Disease Clinics*. 2020;34(4):887-902.

181. Yiş R, Sarı AN, Gülay Z. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında plazmid aracılı yüksek düzey aminoglikozit direncinin araştırılması. Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi. 2020;25(3):423-32.
182. Gokmen TG, Nagiyev T, Meral M, Onlen C, Heydari F, Koksall F. NDM-1 and rmtC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkey. Jundishapur Journal of Microbiology. 2016;9(10):e33990.
183. Al Sheikh YA, Marie MAM, John J, Krishnappa LG, Dabwab KHM. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Saudi Arabia. Libyan Journal of Medicine. 2014;9(1):24432.
184. Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S ve ark. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2013;68(7):1543-50.
185. Gür D, Hasdemir U, Çakar A, Çavuşoğlu İ, Çelik T, Aksu B ve ark. Comparative in vitro activity of plazomicin and older aminoglycosides against *Enterobacterales* isolates; prevalence of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methyltransferases. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2020;97(4):115092.
186. Ermertcan Ş, Yılmaz FF, Taşlı H, Yurtma AN. Aminoglikozit dirençli gram negatif bakterilerde plazmid aracılı metilaz genlerinin araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 2013;43(1):12-16.
187. Zhan Q, Xu Y, Wang B, Yu J, Shen X, Liu L ve ark. Distribution of fluoroquinolone resistance determinants in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with bloodstream infections in China. BMC Microbiology. 2021;21(1):1-8.
188. Al-Agamy MH, El-Mahdy TS, Radwan HH, Poirel L. Cooccurrence of NDM-1, ESBL, RmtC, AAC (6')-Ib, and QnrB in clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates together with coexistence of CMY-4 and AAC (6')-Ib in *Enterobacter cloacae* isolates from Saudi Arabia. BioMed Research International. 2019;6736897.
189. Arabacı Ç, Dal T, Başıyigit T, Genişel N, Durmaz R. Investigation of carbapenemase and *mcr-1* genes in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. The Journal of Infection in Developing Countries. 2019;13(06):504-9.
190. Hazırolan G, Karagöz A. Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 high-risk clone in Turkey. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2020;67(4):216-21.
191. Bialvaei AZ, Samadi Kafil H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. Current Medical Research and Opinion. 2015;31(4):707-21.

192. Can F, Menekse S, Ispir P, Atac N, Albayrak O, Demir T ve ark. Impact of the ST101 clone on fatality among patients with colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(5):1235-41.
193. Jayol A, Poirel L, Brink A, Villegas M-V, Yilmaz M, Nordmann P. Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(8):4762-66.
194. Longo LG, de Sousa VS, Kraychete GB, Justo-da-Silva LH, Rocha JA, Superti SV ve ark. Colistin resistance emerges in pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Rio de Janeiro, Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2019;54(5):579-86.
195. Lomonaco S, Crawford MA, Lascols C, Timme RE, Anderson K, Hodge DR ve ark. Resistome of carbapenem-and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *PLoS One*. 2018;13(6):e0198526.
196. Shein AMS, Wannigama DL, Higgins PG, Hurst C, Abe S, Hongsing P ve ark. High prevalence of *mgrB*-mediated colistin resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with biofilm formation, and can be overcome by colistin-EDTA combination therapy. *Scientific Reports*. 2022;12(1):1-19.
197. Kong Y, Li C, Chen H, Zheng W, Sun Q, Xie X ve ark. In vivo emergence of colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* mediated by premature termination of the *mgrB* Gene regulator. *Frontiers in Microbiology*. 2021;12:656610.
198. Esposito EP, Cervoni M, Bernardo M, Crivaro V, Cuccurullo S, Imperi F ve ark. Molecular epidemiology and virulence profiles of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* blood isolates from the hospital agency “Ospedale dei Colli,” Naples, Italy. *Frontiers in Microbiology*. 2021;9: 1463.
199. Gentile B, Grottola A, Orlando G, Fregni Serpini G, Venturelli C, Meschiari M ve ark. A retrospective whole-genome sequencing analysis of carbapenem and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* nosocomial strains isolated during an MDR surveillance program. *Antibiotics*, 2020;9(5):246.
200. Jaidane N, Bonnin RA, Mansour W, Girlich D, Creton E, Cotellon G ve ark. Genomic insights into colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a Tunisian teaching hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(2):e01601-17.

201. Novović K, Trudić A, Brkić S, Vasiljević Z, Kojić M, Medić D ve ark. Molecular epidemiology of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Serbia from 2013 to 2016. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(5):e02550-16.
202. Hosbul T, Guney-Kaya K, Guney M, Sakarya S, Bozdogan B, Oryasin E. Carbapenem and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST2096 dominated in two hospitals in Turkey. *Clinical Laboratory*. 2021;67(9).
203. Shankar C, Venkatesan M, Rajan R, Mani D, Lal B, Prakash JAJ ve ark. Molecular characterization of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* & its clonal relationship among Indian isolates. *The Indian Journal of Medical Research*. 2019;149(2):199.
204. Lu Y, Feng Y, McNally A, Zong Z. The occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China. *Frontiers in Microbiology*. 2018;9:2568.
205. López-Camacho E, Gómez-Gil R, Tobes R, Manrique M, Lorenzo M, Galván B ve ark. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2014;69(3):632-36.
206. Gu DX, Huang YL, Ma JH, Zhou HW, Fang Y, Cai JC ve ark. Detection of colistin resistance gene *mcr-1* in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from an infant with diarrhea in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(8):5099-5100.
207. Compain F, Babosan A, Brisse S, Genel N, Audo J, Ailloud F ve ark. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014;52(12):4377-80.
208. Fresno S, Jimenez N, Izquierdo L, Merino S, Corsaro MM, De Castro C ve ark. The ionic interaction of *Klebsiella pneumoniae* K2 capsule and core lipopolysaccharide. *Microbiology*. 2006;152(6):1807-18.
209. Zhu W, Liu Y, Chen F, Chen S, Zhu Y, Li H ve ark. Cooccurrence of antibiotic resistance and hypervirulence in high-risk carbapenem-resistant K14, K64 and Wzi209 *Klebsiella pneumoniae* strains driven by plasmids and their derivatives. *Microbiology Spectrum*. 2022;10(5):e02541-21.
210. Mataseje LF, Boyd DA, Fuller J, Haldane D, Hoang L, Lefebvre B ve ark. Characterization of OXA-48-like carbapenemase producers in Canada, 2011–14. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2018;73(3):626-633.
211. Pitout JD, Peirano G, Kock MM, Strydom KA, Matsumura Y. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019;33(1):e00102-19.

212. Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D ve ark. Diverse sequence types of *Klebsiella pneumoniae* contribute to the dissemination of bla NDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2012;56(5):2735-38.
213. Doi Y, Hazen TH, Boitano M, Tsai Y-C, Clark TA, Korlach J ve ark. Whole-genome assembly of *Klebsiella pneumoniae* coproducing NDM-1 and OXA-232 carbapenemases using single-molecule, real-time sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014;58(10):5947-53.
214. Kim YJ, Kim S, Kim J, Bae S. Tracking short-term changes in the genetic diversity and antimicrobial resistance of OXA-232-producing *Klebsiella pneumoniae* ST14 in clinical settings. *Clinical Microbiology and Infection*. 2020;26(1):78-86.
215. Garcia-Fulgueiras V, Araujo L, Bado I, Cordeiro NF, Mota MI, Laguna G ve ark. Allodemic distribution of plasmids co-harboursing *bla*_{CTX-M-15/aac (6')-Ib-cr/qnrB} in *Klebsiella pneumoniae* is the main source of extended-spectrum β -lactamases in Uruguay's paediatric hospital. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;9:68-73.
216. Isler B, Falconer C, Vatansever C, Özer B, Çınar G, Aslan AT, et al. High prevalence of ArmA-16S rRNA methyltransferase among aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *Journal of Medical Microbiology*. 2022;71(12):001629.
217. Moubareck CA, Mouftah SF, Pál T, Ghazawi A, Halat DH, Nabi A ve ark. Clonal emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST14 co-producing OXA-48-type and NDM carbapenemases with high rate of colistin resistance in Dubai, United Arab Emirates. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2018;52(1):90-5.
218. Rodrigues C, Sousa C, Lopes JA, Novais Â, Peixe L. A front line on *Klebsiella pneumoniae* capsular polysaccharide knowledge: Fourier transform infrared spectroscopy as an accurate and fast typing tool. *Msystems*. 2020;5(2):e00386-19.
219. Shankar C, Vasudevan K, Jacob JJ, Baker S, Isaac BJ, Neeravi AR ve ark. Mosaic antimicrobial resistance/virulence plasmid in hypervirulent ST2096 *Klebsiella pneumoniae* in India: The rise of a new superbug? *BioRxiv*. 2020;12.11.422261.
220. Hala S, Antony CP, Alshehri M, Alsaedi A, Al Thaqafi O, Al-Ahmadi G ve ark. An emerging clone (ST2096) of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 14 with enhanced virulence causes an outbreak in Saudi Arabia. 2020;13(2):363-64.
221. Isler B, Özer B, Çınar G, Aslan AT, Vatansever, C, Falconer C ve ark. Characteristics and outcomes of carbapenemase harbouring carbapenem-resistant *Klebsiella* spp.

- bloodstream infections: a multicentre prospective cohort study in an OXA-48 endemic setting. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2022;41(5):841-847.
222. Martin J, Phan HT, Findlay J, Stoesser N, Pankhurst L, Navickaite I ve ark. Covert dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* (KPC) in a successfully controlled outbreak: long-and short-read whole-genome sequencing demonstrate multiple genetic modes of transmission. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(11):3025-34.
 223. Mendes G, Ramalho JF, Bruschy-Fonseca A, Lito L, Duarte A, Melo-Cristino J ve ark. Whole-genome sequencing enables molecular characterization of non-clonal group 258 high-risk clones (ST13, ST17, ST147 and ST307) among Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a tertiary University Hospital Centre in Portugal. *Microorganisms*. 2022;10(2):416.
 224. Furlan JPR, Savazzi EA, Stehling EG. Genomic insights into multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* co-harboring metal resistance genes in aquatic environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2020;201:110782.
 225. Damjanova I, Toth A, Paszti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J ve ark. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2008;62(5):978-85.
 226. Peirano G, Chen L, Kreiswirth BN, Pitout JD. Emerging antimicrobial-resistant high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones ST307 and ST147. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2020;64(10):e01148-20.
 227. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015;59(10):5873-84.
 228. Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* isolates that produce carbapenemases: first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013;57(1):130-36.
 229. Mansour W, Haenni M, Saras E, Grami R, Mani Y, Khalifa ABH ve ark. Outbreak of colistin-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Tunisia. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017;10:88-94.

230. Sonnevend Á, Ghazawi A, Hashmey R, Haidermota A, Girgis S, Alfaresi M ve ark. Multihospital occurrence of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 147 with an IS Ecp1-directed bla OXA-181 insertion in the *mgrB* gene in the United Arab Emirates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017;61(7):e00418-17.
231. Avgoulea K, Di Pilato V, Zarkotou O, Sennati S, Politi L, Cannatelli A ve ark. Characterization of extensively drug-resistant or pandrug-resistant sequence type 147 and 101 OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* causing bloodstream infections in patients in an intensive care unit. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2018;62(7):e02457-17.
232. Lepuschitz S, Schill S, Stoeger A, Pekard-Amenitsch S, Huhulescu S, Inreiter N ve ark. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Science of the Total Environment*. 2019;662:227-35.
233. Loucif L, Kassah-Laouar A, Saidi M, Messala A, Chelaghma W, Rolain, JM. Outbreak of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* involving a sequence type 101 clone in Batna University Hospital, Algeria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016;60(12):7494-7497.
234. Frenk S, Rakovitsky N, Temkin E, Schechner V, Cohen R, Kloyzner BS ve ark. Investigation of outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in three neonatal intensive care units using whole genome sequencing. *Antibiotics*. 2019;9(10):705.
235. Zhu J, Sun L, Ding B, Yang Y, Xu X, Liu W ve ark. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST76 and ST37 isolates in neonates. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2016;35(4):611-18.
236. Li P, Wang M, Li X, Hu F, Yang M, Xie Y ve ark. ST37 *Klebsiella pneumoniae*: development of carbapenem resistance in vivo during antimicrobial therapy in neonates. *Future Microbiology*. 2017;12(10):891-904.
237. Yang J, Ye L, Guo L, Zhao Q, Chen R, Luo Y ve ark. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clinical Microbiology and Infection*. 2013;19(11):E509-E15.
238. Ramsamy Y, Mlisana KP, Allam M, Amoako DG, Abia AL, Ismail A ve ark. Genomic analysis of carbapenemase-producing extensively drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals the horizontal spread of p18-43_01 plasmid encoding bla NDM-1 in South Africa. *Microorganisms*. 2020;8(1):137.

239. Al-Baloushi AE, Pál T, Ghazawi A, Sonnevend A. Genetic support of carbapenemases in double carbapenemase producer *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Arabian Peninsula. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2018;65(2):135-50.
240. Shortridge D, Carvalhaes C, Deshpande L, Castanheira M. Activity of meropenem/vaborbactam and comparators against Gram-negative isolates from Eastern and Western European patients hospitalized with pneumonia including ventilator-associated pneumonia (2014–19). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2021;76(10):2600-5.
241. Düzgün AÖ, Saral A. Next-generation sequencing of plasmid carrying bla OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Turkey. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 2019;66(2):261-72.
242. Lahlaoui H, Poirel L, Barguelli F, Moussa MB, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tunisia. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2012;31(6):937-939.
243. Hetland MAK, Hawkey J, Bernhoff E, Bakksjø R-J, Kaspersen H, Rettedal SI ve ark. Within-patient and global evolutionary dynamics of *Klebsiella pneumoniae* ST17. *bioRxiv*. 2022;11.01.514664.
244. Aires CAM, Rocha-de-Souza CM, Timm LN, Pereira PS, Carvalho-Assef APDA, Asensi MD. Early detection of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* ST17 co-harboring blaCTX-M-8 in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2016;86(4):434-36.
245. Jin Y, Shao C, Li J, Fan H, Bai Y, Wang Y. Outbreak of multidrug resistant NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from a neonatal unit in Shandong Province, China. *PLoS One*. 2015;10(3):e0119571.
246. Leung LM, Cooper VS, Rasko DA, Guo Q, Pacey MP, McElheny CL ve ark. Structural modification of LPS in colistin-resistant, KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2017;72(11):3035-42.
247. Castanheira M, Farrell SE, Wanger A, Rolston KV, Jones RN, Mendes RE. Rapid expansion of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in two Texas hospitals due to clonal spread of ST258 and ST307 lineages. *Microbial Drug Resistance*. 2013;19(4):295-297.
248. Habeeb MA, Haque A, Nematzadeh S, Iversen A, Giske CG. High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013;41(6): 524-526.

249. Wyres KL, Hawkey J, Hetland MA, Fostervold A, Wick RR, Judd LM ve ark. Emergence and rapid global dissemination of CTX-M-15-associated *Klebsiella pneumoniae* strain ST307. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2019;74(3):577-581.
250. Bocanegra-Ibarias P, Garza-González E, Morfin-Otero R, Barrios H, Villarreal-Treviño L, Rodríguez-Noriega E ve ark. Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico. *PloS one*. 2017;12(6):e0179651.
251. Villa L, Feudi C, Fortini D, Brisse S, Passet V, Bonura C ve ark. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. *Microbial Genomics*. 2017;3(4):e000110.
252. Belbel Z, Chettibi H, Dekhil M, Ladjama A, Nedjai S, Rolain J-M. Outbreak of an *armA* methyltransferase-producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* clone in a pediatric Algerian Hospital. *Microbial Drug Resistance*. 2014;20(4):310-15.
253. Karampatakis T, Zarras C, Pappa S, Vagdatli E, Iosifidis E, Roilides E ve ark. Emergence of ST39 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing VIM-1 and KPC-2. *Microbial Pathogenesis*. 2022;162:105373