

Bir Üniversite Hastanesinde 2010-2014 Yılları Arasında İzole Edilen *Enterobacteriaceae* Türlerinin Karbapenemaz Genlerinin Araştırılması ve Moleküler Epidemiyolojisinin Belirlenmesi*

Investigation of Carbapenemase Genes and Molecular Epidemiology of *Enterobacteriaceae* Strains Isolated between 2010-2014 in a University Hospital

Hüseyin Haydar KUTLU^{1,2}, Ebru US^{2,3}, Alper TEKELİ²

¹ Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uşak.

¹ Uşak University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Uşak, Turkey

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey

³ Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi, Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı, Ankara.

³ Ankara University Faculty of Medicine, İbni Sina Hospital, Microbiology Central Laboratory, Ankara, Turkey

* Bu çalışma, Hüseyin Haydar Kutlu'nun tıpta uzmanlık tez yayınıdır ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 13L3330015 proje numarası ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi (Received): 13.07.2017 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 28.11.2017

ÖZ

Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının dünya genelindeki yayılımı halk sağlığı açısından önemli bir tehdit olmaya başlamıştır. Oldukça endişe verici bu tablo; karbapenemazların taranması, tespit edilmesi ve yayılımının önlenmesi gibi konularda yeni yöntemlerin geliştirilmesini ve epidemiyolojik veri toplanmasını zorunlu kılmaktadır. Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Merkez Laboratuvarı'na 2010 Haziran-2014 Mayıs tarihleri arasında farklı servislerden gelen klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında karbapenemaz genlerinin varlığı ve dağılımı ile bunların birbirleri ile olan klonal ilişkisinin ortaya konulması amaçlanmıştır. Ertapeneme karşı orta duyarlı ya da dirençli bulunan 112 izolat Phoenix (BD

İletişim (Correspondence): Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Haydar Kutlu, Uşak Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uşak, Türkiye.

Tel (Phone): +90 506 687 5647, **E-posta (E-mail):** huseyin.kutlu@usak.edu.tr

Diagnostic Systems, Sparks, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemi ile tanımlanmıştır. İzolatların DNA ekstraksiyonunu takiben polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile 11 adet karbapenemaz kodlayan genler (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GIM}*, *blaSIM*, *bla_{AIM}*, *bla_{DIM}* ve *bla_{BIC}*) incelenmiştir. İzolatlar arasındaki klonal ilişki, izolatların DNA makrorestriksiyon enzimi XbaI ile kesimi sonrası PFGE yöntemi ile araştırılmıştır. İncelenen 112 bakteriyel izolatın çoğunluğunu *Klebsiella pneumoniae* (n= 79, %70.5) oluşturmakta iken bunu sırasıyla *Escherichia coli* (n= 15, %13.4), *Enterobacter cloacae* (n= 10, %8.9), *Enterobacter aerogenes* (n= 4, %3.6) ve *Klebsiella oxytoca* (n= 4, %3.6) takip etmiştir. İzolatlarda en sık olarak *bla_{OXA-48}* geninin varlığı saptanmıştır. İzolatların 83 (%74.1) tanesinde *bla_{OXA-48}* geni varlığı tek başına, 7 (%6.3) tanesinde ise *bla_{VIM}* geni ile birlikte tespit edilmiştir. Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta *bla_{VIM}* geni saptanmış olup toplam 9 (%8) izolatta pozitif olarak bulunmuştur. *bla_{NDM}* geni 2 (%1.8) izolatta tanımlanmıştır. PFGE ile incelenen izolatlar arasında 10 *K.pneumoniae* izolatı aynı PFGE paternine sahip bulunmuş ve pulsotip B olarak isimlendirilmiştir. Bu izolatlar; izole edildikleri yer, izolasyon tarihleri, antibiyotik direnç paternleri ve taşıdıkları karbapenemaz genleri açısından benzer bulunmuş ve yoğun bakım servislerinde ortaya çıkan muhtemel bir salgına ait izolatlar olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada ayrıca polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen klinik örneklerde de karbapenemaz genleri belirlenmiştir. Polikliniğe başvuran hastalarda böyle bir durumun görülmesi, *bla_{OXA-48}* üreten bakterilerin endemik olduğu ülkemizde karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyelerinin neden olduğu toplum kökenli enfeksiyonların da karşımıza çıkabileceğini düşündürmüştür. Bu çalışmadan elde ettiğimiz verilere göre, hastanemizde *bla_{OXA-48}* üreten gram-negatif bakteriler sıklıktır. Metallo-beta-laktamazlar arasında *bla_{VIM}* geninin varlığı ve *bla_{OXA-48}* karbapenemaz geni ile birlikteliği dikkat çekmektedir. Hastanemizde *bla_{NDM}* üreten bakterilerin sıklığı henüz yüksek seviyede bulunmamıştır. Bu çalışmada, hastanemizde karbapenemaz üreten bakterilerin salgın suşu olarak belirlenmesi, her hastanenin aralıklı olarak karbapenemaz üreten bakteriler yönünden kesitsel surveyans yapmasının salgınların erken tanısı açısından değerli olacağına dikkat çekmektedir.

Anahtar sözcükler: *Enterobacteriaceae*; karbapenem direnci; karbapenemaz kodlayan genler; OXA-48; pulsed-field jel elektroforezi.

ABSTRACT

The worldwide spread of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* isolates has become a major threat of public health. This worrisome situation leads the development of new methods for carbapenemase screening, detection, prevention of spread and epidemiological data collection as mandatory. In this study, it was aimed to investigate existence and distribution of carbapenemase-encoding genes (CEGs) among carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolated from various clinical samples in Ankara University Faculty of Medicine, İbni Sina Hospital, Central Microbiology Laboratory between June 2010-May 2014 and detect their clonal relationship. A total of 112 non-repetitive *Enterobacteriaceae* isolates which were intermediate or resistant to ertapenem were identified by using Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, USA) automated microbiology system. After DNA extraction from the isolates, 11 carbapenemase-encoding genes (CEGs) (*bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{SPM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{GIM}*, *blaSIM*, *bla_{AIM}*, *bla_{DIM}* ve *bla_{BIC}*) were detected with PCR. The clonal relationship among the isolates was determined by PFGE method following digestion with XbaI DNA macrorestriction endonuclease. Among 112 isolates *Klebsiella pneumoniae* was the most frequent (n= 79, 70.5%) bacteria followed by *Escherichia coli* (n= 15, 13.4%), *Enterobacter cloacae* (n= 10, 8.9%), *Enterobacter aerogenes* (n= 4, 3.6%) and *Klebsiella oxytoca* (n= 4, 3.6%) respectively. *bla_{OXA-48}* was the most frequent gene detected. Among 83 (74.1%) isolates *bla_{OXA-48}* was detected alone and in 7 (6.3%) of the isolates it was identified with *bla_{VIM}* gene coexistence. *bla_{VIM}* gene was identified as the second most frequent CEG among the isolates. *bla_{VIM}* gene was detected positive in 9 (8%) isolates. *bla_{NDM}* gene was identified in 2 (1.8%) isolates. Ten of the *K.pneumoniae* isolates with identical PFGE pattern were named as pulsotype B. These isolates were found to be similar in terms of isolate location, isolation dates, antibiotic resistance patterns and the carbapenemase genes they carry, and are considered to be potential outbreak isolates originated from intensive care units. On the other hand CEGs were found in the clinical samples

obtained from five out-patients suggesting that community-acquired infections may also arise due to carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in our country where *bla*_{OXA-48} producers are endemic. According to this study, *bla*_{OXA-48} producing gram negative bacteria were frequent in our hospital. The prevalence of *bla*_{VIM} gene among metallo-beta-lactamases and coexistence with *bla*_{OXA-48} gene was remarkable. The frequency of *bla*_{NDM} producing isolates in our hospital was not detected as high yet. In this study, the identification of carbapenemase producing bacteria as outbreak strains in our hospital indicated that cross-sectional surveillance for carbapenemase-producing bacteria from each patient was valuable in terms of early diagnosis of outbreaks.

Keywords: Carbapenem resistance; carbapenemase-encoding genes; *Enterobacteriaceae*; OXA-48; pulsed-field gel electrophoresis.

GİRİŞ

Son yıllarda *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında ortaya çıkan bakteriyel direnç mekanizmaları arasında karbapenemaz üretimi önemli bir yer tutmaktadır. Karbapenemazların da tıpkı genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlarda (GSBL) olduğu gibi kısa bir süre içinde kontrolden çıkmasından ve toplum kökenli enfeksiyonlarda bile karşımıza çıkacak kadar yaygın bir hal almasından endişe edilmektedir. Bu durum, dirençli gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında kullandığımız son basamak ilaçlar olan karbapenem grubu antibiyotiklerin artık kullanılamaz hale gelmesi anlamına gelmektedir¹⁻³. Karbapenemaz enzimi salgılanmasına yol açan genlere sahip izolatlarda karbapenemlere karşı yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri bildirilmiş olup, bazı izolatlarda polimiksinler ve glisilsiklinler de dahil olmak üzere tüm antibakteriyellere dirençli izolatlar tanımlanmıştır³. Bu durum, karbapenemazların taranması, tespit edilmesi ve yayılımının önlenmesi gibi konularda yeni yöntemlerin geliştirilmesini ve epidemiyolojik veri toplanmasını zorunlu kılmaktadır.

Bu çalışmada, karbapenem dirençli gram-negatif enterik bakterilerde farklı karbapenemaz genlerinin araştırılarak hastanemize ait verilerin elde edilmesi, PFGE yöntemiyle izolatların klonal ilişkilerinin ve olası salgın durumlarının saptanması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bakteri İzolatlarının Elde Edilmesi ve Tanımlanması

2010 Haziran ayı ile 2014 Mayıs ayı arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Mikrobiyoloji Merkez Laboratuvarı'na; cerrahi servisler (n= 45, %40), reanimasyon ünitesi (n= 29, %26), iç hastalıkları servisleri (n= 19, %17), cerrahi yoğun bakım üniteleri (n= 13, %12) ve iç hastalıkları yoğun bakım ünitelerinden (n= 6, %5) gönderilen; kan, deri ve yumuşak doku, idrar, solunum yolu ve steril vücut sıvısı örneklerinden izole edilen ve "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)"⁴ önerilerine göre, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle ertapeneme orta duyarlılık ya da direnç gösteren izolatlar çalışmaya dahil edildi ve tür tayinleri Phoenix (BD Diagnostic Systems, Sparks, ABD) otomatize mikrobiyoloji sistemiyle yapıldı.

Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Polimer zincir reaksiyonu (PCR) karışımı ve döngü koşulları Poirel ve arkadaşlarının⁵ geliştirdikleri yöntemle göre uygulandı. Multipleks PCR, üç ayrı PCR reaksiyonunda gerçekleştirildi. Birinci reaksiyonda *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BIC}, *bla*_{NDM} ve *bla*_{KPC} genleri; ikinci reaksiyonda *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM} ve *bla*_{VIM} genleri; üçüncü reaksiyonda ise *bla*_{AIM}, *bla*_{GIM}, *bla*_{SIM} ve *bla*_{DIM} genleri araştırıldı.

PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Daha sonra 312 nm'de UV transillüminatör (Vilber- Lourmat TFX-20.M [ETX-20 M], Fransa) ile değerlendirildi. DNA baz çift standartı olarak GeneRuler DNA Ladder 50 baz çifti (bp) (Thermo Scientific, ABD) kullanıldı.

Karbapenemaz kodlayan gen (KKG) pozitif kontrol olarak "European survey on carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*" (EuSCAPE) *Klebsiella pneumoniae* 1943 (*bla*_{OXA-48} pozitif), *K.pneumoniae* 1944 (*bla*_{KPC-2} pozitif), *K.pneumoniae* 1945 (*bla*_{VIM-1} pozitif), *K.pneumoniae* 1946 (*bla*_{NDM-1} pozitif), *K.pneumoniae* 1947 (*bla*_{IMP-1} pozitif), nadir karbapenemaz kodlayan genler için karbapenemaz kodlayan gen pozitif olarak bulunan klinik izolatlar kullanıldı.

Pulsed Field Jel Elektrofrezisi

İzolatlar arasındaki klonal ilişki "Centers for Disease Control and Prevention (CDC)" protokolleri⁶ kullanılarak PFGE yöntemiyle araştırıldı ve GelCompar II (Applied Biosystems, Belçika) programı kullanılarak analiz edildi. "Unweighted pair group method with mathematical averaging (UPGMA)" yöntemi ve Dice benzerlik katsayısı (Dice similarity coefficient) kullanılarak PFGE profillerinin dendrogramları oluşturuldu ve kümelenme analizi yapıldı.

İstatistiksel Analiz

Elde edilen verilerin analizi SPSS for Windows 15 paket programında yapıldı. Kategorik değişkenler arasındaki farkın anlamlılığı Pearson Ki-Kare veya Fisher Exact testi ile değerlendirildi. $p < 0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmaya cerrahi servisler (n= 45, %40), reanimasyon ünitesi (n= 29, %26), dahili servisler (n= 19, %17), cerrahi yoğun bakım üniteleri (n= 13, %12) ve iç hastalıkları yoğun bakım ünitelerinden (n= 6, %5) gönderilen 112 klinik örnekten izole edilen ertapeneme azalmış duyarlılık gösteren 112 bakteri dahil edilmiştir. Bu örneklerin sırasıyla; deri ve yumuşak doku (n= 35, %31.3), kan (n= 28, %25), idrar (n= 23, %20.5), solunum yolu (n= 17, %15.2) ve steril vücut sıvılarından (n= 9, %8) alındığı belirlenmiştir. Bu örneklerin 59 (%51.3)'ünün invaziv, 56 (%48.7)'sinin non-invaziv yöntemlerle alınan klinik örnekler olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen 112 izolatın çoğunluğunu *K.pneumoniae* (n= 79, %70.5) oluşturmaktayken bunu sırasıyla *E.coli* (n= 15, %13.4), *E.cloacae* (n= 10, %8.9), *E.aerogenes* (n= 4, %3.6) ve *K.oxytoca* (n= 4, %3.6)'nın izlediği belirlenmiştir.

Tablo 1. Karbapenemaz Genlerinin Türler Arasında Dağılımı

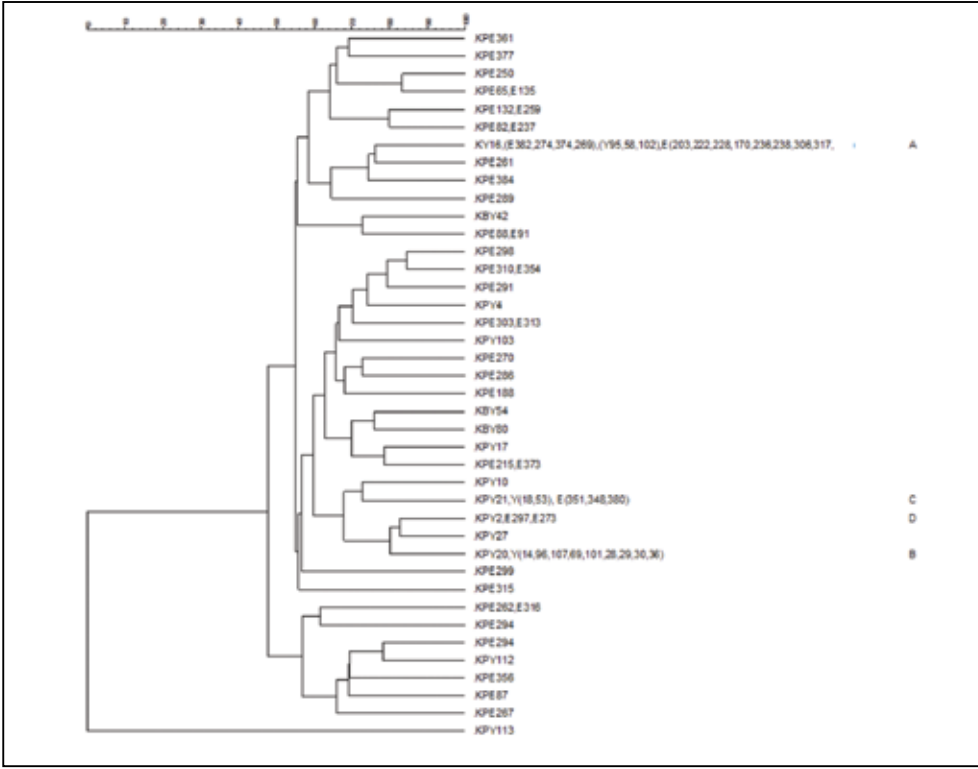
	OXA-48		VIM		NDM		OXA-48 +VIM	
	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>K.pneumoniae</i>	64 %81	15 %19	5 %6.3	74 %93.7	2 %2.5	77 %97.5	4 %5.1	75 %94.9
<i>E.coli</i>	14 %93.3	1 %6.7	2 %13.3	13 %86.7	0 %0	15 %100	2 %13.3	13 %86.7
<i>E.cloacae</i>	6 %60	4 %40	2 %20	8 %80	0 %0	10 %100	1 %10	9 %90
<i>E.aerogenes</i>	2 %50	2 %50	0 %0	4 %100	0 %0	4 %100	0 %0	4 %100
<i>K.oxytoca</i>	4 %100	0 %0	0 %0	4 %100	0 %0	4 %100	0 %0	4 %100
p	p= 0.117		p= 0.367		p= 1.0		p= 0.570	

İzolatlarda en sık olarak *bla*_{OXA-48} geni saptanmıştır. İzolatların 83 (%74.1) tanesinde tek başına, 7 (%6.3) tanesinde ise *bla*_{VIM} geni ile birlikte *bla*_{OXA-48} tespit edilmiştir. *bla*_{OXA-48} üreten bakterilerin türlere göre dağılımında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p= 0.117) (Tablo 1). *bla*_{OXA-48} üreten bakterilerin servislere göre dağılımı incelendiğinde en sık reanimasyon ünitesinden (n= 24, %26.7) gelen örneklerde *bla*_{OXA-48} geni varlığı tespit edilmiştir. Karbapenemaz genleri arasında ikinci sıklıkta *bla*_{VIM} geni saptanmış olup toplam 9 (%8) izolatta enzim pozitif bulunmuştur. *bla*_{VIM} üreten bakterilerin beş tanesi *K.pneumoniae*, ikisi *E.coli* ve ikisi *E.cloacae* izolatında saptanmıştır. İki *K.pneumoniae* izolatında *bla*_{NDM} pozitifliği tespit edilmiştir (Tablo 1).

Toplam 112 izolatın 18 (%16.1)'inde [12 (%66.7) *K.pneumoniae*, 3 (%16.7) *E.cloacae*, 2 (%11.1) *E.aerogenes*, 1 (%5.6) *E.coli*] araştırılan karbapenemaz genleri negatif bulunmuştur.

PFGE analiz sonuçlarına göre *K.pneumoniae* izolatlarının dört pulsotip altında (A-D) kümelendiği saptanmıştır. İzolatların 16 (%14.3) tanesi pulsotip A, 10 (%8.9) tanesi pulsotip B, 6 (%5.4) tanesi pulsotip C ve 3 (%2.7) tanesi de pulsotip D olarak kümelene göstermiştir. Pulsotip B ile pulsotip D'deki izolatlar birbiriyle olası ilişkili bulunmuştur. Diğer gruplar arasındaki benzerlik oranı %70'in altında saptanmış ve ilişkisiz olarak değerlendirilmiştir (Şekil 1).

Farklı PFGE paternlerine sahip *K.pneumoniae* izolatlarının servislere göre dağılımı incelendiğinde pulsotip A ve pulsotip C izolatları herhangi bir serviste istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmazken pulsotip B izolatları reanimasyon ünitesinde anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (p= 0.031). Pulsotip B izolatlarının yoğun bakım ve yoğun bakım dışı bölümler arasındaki dağılımı incelendiğinde ise yoğun bakım ünitelerinde anlamlı oranda yüksek saptandığı belirlenmiştir (p= 0.002). Örneklerin laboratuvara kabul tarihlerine bakıldığında tamamının 2013 yılı sonu ve 2014 yılı ilk yarısında gönderildiği belirlenmiştir.



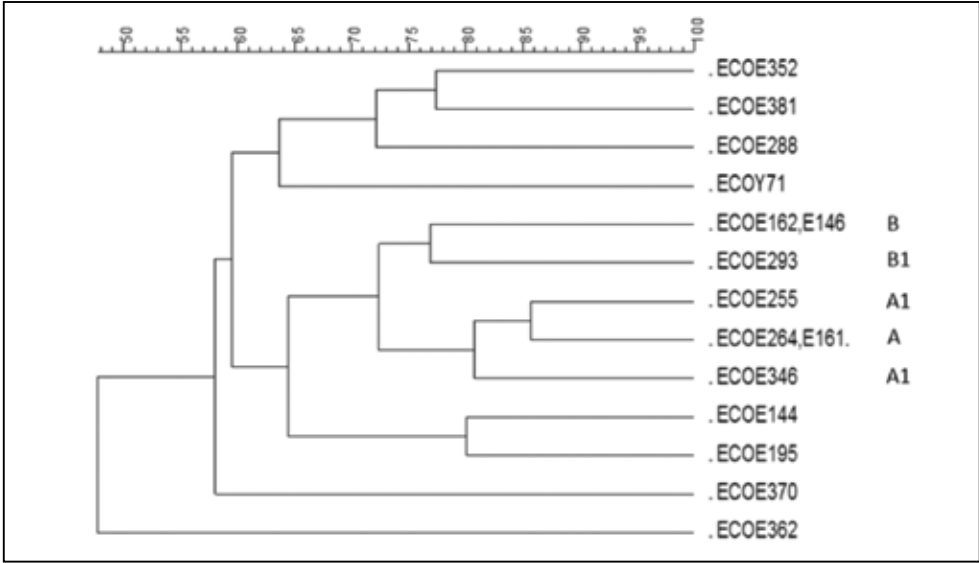
Şekil 1. *K.pneumoniae* izolatlarına ait PFGE dendrogramı ve pulsotipler.

İzolasyon zamanları, yerleri ve fenotipik-genotipik özelliklerindeki benzerlikler, İbni Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde pulsotip B'deki izolatların neden olduğu bir salgın olarak düşünülmüştür.

Pulsotip D ile pulsotip B'ye ait izolatlar muhtemel ilişkili izolatlar olarak değerlendirilmiştir ancak pulsotip B izolatları gibi yoğun bakım ünitesinden gönderilen örneklerden oluşan pulsotip D paternindeki izolatlar antibiyotik direnç profilleri ve MİK değerleri açısından pulsotip B izolatlarından farklı bulunmuştur.

İncelenen 15 *E.coli* izolatının PFGE sonuçları değerlendirildiğinde iki pulsotip altında (A ve B) kümelenme saptanmıştır. Pulsotip A iki izolat içermektedirken iki izolat da (A1) bunlarla yakın ilişkili bulunmuştur. Pulsotip B'yi iki izolat oluşturmaktayken bir izolat (B1) yakın ilişkili bulunmuştur. Pulsotip A ve B'deki izolatlar, birbiriyle muhtemel ilişkili bulunmuştur. Bu altı izolatın dışındaki örneklerin tekli ya da en fazla birbiriyle ilişkili ikili izolatlar olacak şekilde PFGE profili gösterdikleri saptanmıştır (Şekil 2).

İncelenen *E.cloacae*, *E.aerogenes* ve *K.oxytoca* izolatları tekli ya da en fazla ikili izolatlardan oluşan pulsotipler halinde dağılım göstermiştir.



Şekil 2. *E.coli* izolatlarına ait PFGE dendrogramı ve pulsotipler.

Polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen örneklerde KKG'lere rastlanmıştır. Gelen örneklerden üçü idrar örneği olup bla_{OXA-48} geni pozitif *K.pneumoniae* izole edilmiş, diğer iki yara örneğinden birinde bla_{OXA-48} ve bla_{VIM} genleri birlikte pozitif olan *K.pneumoniae* izolatı, diğerinde ise yine bla_{OXA-48} ve bla_{VIM} birlikteliği gösteren *E.cloacae* izolatı tanımlanmıştır. Hastalardan üçünün poliklinik başvurularının öncesinde hastaneye yatış ve cerrahi girişim öyküsü saptanırken, kalan iki hastanın son altı ayda hastaneye yatış öyküsü tespit edilmemiştir.

TARTIŞMA

Karbapenemaz üreten bakterilerin hızlı ve doğru şekilde saptanması, hem doğru tedavi şemalarını belirleyebilmek hem de hastanede oluşabilecek bir salgın durumunu engellemek için gereklidir⁷.

Karbapenemaz üreten bakterilerin belirlenmesi ve birbirinden ayırt edilmesinde moleküler yöntemler altın standart olmaya devam etmektedir. Çalışmamızda 112 izolattan 94 tanesinde en az bir KKG'ye rastlanırken, kalan 18 izolatta KKG açısından negatif sonuç alınmıştır. İzolatlarda araştırılan 11 KKG içinde bla_{OXA-48} , bla_{VIM} ve bla_{NDM} geni pozitif izolatlar rastlanırken, bla_{KPC} , bla_{IMP} , bla_{SPM} , bla_{BIC} , bla_{AIM} , bla_{DIM} , bla_{GIM} ve bla_{SIM} gen pozitif izolatlar saptanmamıştır.

bla_{OXA-48} sınıf D beta-laktamazlar arasında yer alan, plazmitle aktarım gösteren, klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi inhibitörlere dirençli karbapenemazlardan biridir⁸. İlk olarak 2001 yılında ülkemizde saptanan bu gen, 54 yaşındaki bir erkek hastanın idrar yolu örneğinden tanımlanmıştır⁹. Carrër ve arkadaşları¹⁰ İstanbul'da Mayıs 2006-

Ocak 2007 tarihleri arasında ortaya çıkan ve *bla*_{OXA-48} üreten *K.pneumoniae* izolatlarının neden olduğu bir salgın bildirmişlerdir. Aktaş ve arkadaşları¹¹ yaptıkları çalışmada *bla*_{OXA-48} üreticisi *K.pneumoniae* izolatlarının İstanbul'da görülmeye devam ettiği bildirilmiştir. Uzun bir dönem boyunca *bla*_{OXA-48} bildirimleri sadece Türkiye'den yapılmışken artık pek çok Orta Doğu ve Kuzey Afrika ülkesinde *bla*_{OXA-48} pozitif izolatlar sıklıkla saptanmaktadır ve bu bölge *bla*_{OXA-48} üreten bakterilerin merkez üssü olarak kabul edilmektedir^{12,13}. Yapılan araştırmalar *bla*_{OXA-48} üreten bakterilerin ülkemizde yaygın olarak görülmeye devam ettiğini göstermektedir¹⁴⁻¹⁸. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde 137 hastadan elde edilen karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının dahil edildiği bir çalışmada izolatların 94 tanesinde KKG'lere rastlanmıştır. Bunların %91.5'i tek başına *bla*_{OXA-48} üreten izolatlardır¹⁴. Zarakolu ve arkadaşları¹⁹ karbapenem dirençli *K.pneumoniae* kolonizasyonu açısından inceledikleri 4105 hastadan izole edilen 279 izolatın 270'inin *bla*_{OXA-48}-benzeri karbapenemaz taşıdığını bildirmiştir.

Bu çalışmada da en sık olarak *bla*_{OXA-48} geni saptanmıştır. Bakteriyel izolatların 83 (%74.1) tanesinde tek başına, 7 (%6.3) tanesinde ise *bla*_{VIM} geni ile birlikte olmak üzere izolatların %80.4 (n= 90)'ünde *bla*_{OXA-48} geni pozitifliği tespit edilmiştir. *bla*_{OXA-48} üreten bakterilerin %71.1 (n= 64)'ini *K.pneumoniae* türü bakteriler oluşturmakta iken, %15.6 (n= 14)'sı *E.coli*, %6.7 (n= 6)'si *E.cloacae*, %4.5 (n= 4)'i *K.oxytoca* ve %2.2 (n= 2)'si *E.aerogenes* türlerine ait bulunmuştur.

İlk olarak 1997 yılında Verona, İtalya'da bir *P.aeruginosa* izolatında tanımlanan *bla*_{VIM} geni daha sonra diğer *Enterobacteriaceae* bakterilerine, özellikle de *K.pneumoniae* türüne geçerek yayılım göstermiştir²⁰. *bla*_{VIM} karbapenemaz üreten *K.pneumoniae* izolatları, *bla*_{KPC} üreten izolatlar kadar olmasa da dünya genelinde giderek artan sayıda bildirilmektedir²¹. Türkiye'de ise ilk defa 2007 yılında çok ilaca dirençli ve *bla*_{CTX-M-15} pozitif bir *K.pneumoniae* klinik izolatında *bla*_{VIM-1} metallo-beta-laktamaz geni saptanmıştır²². Demir ve arkadaşları¹⁶ çalışmalarında karbapenemaz geni bulunduran 57 izolatın iki tanesinde *bla*_{VIM} geni pozitifliği bildirmişlerdir.

Çalışmamızda KKG'leri arasında ikinci sıklıkta *bla*_{VIM} geninin varlığı saptanmış olup toplam⁹ (%8) izolatta pozitif olarak bulunmuştur. Bunlardan yedi tanesinde aynı zamanda *bla*_{OXA-48} geni de pozitifdir. *bla*_{VIM} üreten bakterilerin 5 (%55.6) tanesini *K.pneumoniae* izolatları oluşturmaktayken, 2 (%22.2) *E.coli* ve 2 (%22.2) *E.cloacae* izolatında *bla*_{VIM} pozitifliği saptanmıştır.

*bla*_{NDM-1} son keşfedilen, aktarılabılır özellikte olan, moleküler Sınıf B beta-laktamazdır. İlk defa 2009 yılında İsviçre'deki bir hastadan izole edilen *K.pneumoniae* ve *E.coli* izolatlarında tanımlanmıştır²³. Türkiye'de ilk kez 2011 Ekim ayında İstanbul yakınlarındaki bir hastanenin hematoloji ünitesine kabul edilen 16 yaşındaki bir erkek hastadan izole edilen *K.pneumoniae* izolatında *bla*_{NDM} pozitifliği belirlenmiştir²⁴. Alp ve arkadaşlarının¹⁴ yaptıkları çalışmada 94 adet karbapenemaz üreten izolatın dört tanesinde tek başına ve bir tanesinde *bla*_{OXA-48} geni ile birlikte *bla*_{NDM-1} pozitifliği saptanmıştır. Demir ve ar-

kadaşlarının¹⁶ yaptıkları çalışmada inceledikleri 95 adet *Enterobacteriaceae* izolatının 6 (%6.3)'sında bla_{NDM-1} geni saptamışlardır. İstanbul'da bir hastanede 2014-2016 yılları arasında izole edilen karbapenem dirençli 76 izolatın incelendiği çalışmada ise, izolatların 17'sinde bla_{NDM} geni pozitif olarak saptanmış ve elde edilen yüksek oran dikkat çekici bulunmuştur¹⁸.

Çalışmamızda bla_{NDM} geni 2 (%1.8) bakteriyel izolatta tanımlanmıştır. bla_{NDM} geninin saptandığı her iki izolat da *K.pneumoniae* türündedir. bla_{NDM} üreticilerinden bir tanesi kardiyoloji kliniğinden gönderilen idrar örneğinde saptanırken diğeri ise beyin cerrahisi kliniğinden gönderilen kan kültüründen elde edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen görece düşük bla_{NDM} pozitiflik oranı, dahil edilen bakterilerin izolasyon tarihlerinin 2010-2014 yılları arası olması ve bu dönemde ülkemizden bildirilen bla_{NDM} pozitifliğinin daha düşük olması ile ilişkili olabilir.

Dünya genelinde karbapenemaz üreten izolatlar ile ortaya çıkan küçük ya da büyük çaptaki pek çok salgın durumu bildirilmektedir. Voulgari ve arkadaşları²⁵ Yunanistan'da 2011 Aralık-2012 Mart tarihleri arasında dokuz hastadan izole ettikleri 13 ertapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatını incelemişler ve izolatların tamamının bla_{OXA-48} geni taşıdığını ve tek bir PFGE klonuna ait olduklarını saptamışlardır. Ducomble ve arkadaşları²⁶ Almanya'da bir hastanede 2010 Haziran-2012 Temmuz ayları arasında bla_{KPC-2} üreten *K.pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan geniş bir hastane salgınını bildirmişlerdir. Fransa'da bir üniversite hastanesinden bildirilen büyük çaptaki bir salgında ise indeks olgudaki bla_{OXA-48} üreten izolatın geç tanımlanmasının da katkısıyla üç farklı bölümde 15 aylık dönem içerisinde 72 sekonder olgu ortaya çıkmıştır²⁷. Ülkemizde bla_{OXA-48} üreten *K.pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan ilk salgın 2008 yılında bildirilmiştir. Bu salgında 2006 Mayıs-2007 Şubat tarihleri arasında toplanan 39 izolatın iki klonu ait olduğu ve her iki klondaki izolatların hepsinin bla_{OXA-48} ürettiği saptanmıştır¹⁰. Carrër ve arkadaşlarının²⁸ yaptığı ve çoğunluğunu Türkiye'den elde ettikleri bla_{OXA-48} üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarını içeren çalışmada bla_{OXA-48} geninin yayılımının belli bir *K.pneumoniae* klonu aracılığıyla olmadığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda PFGE ile incelenen izolatlar arasında *K.pneumoniae* türündeki 10 izolat aynı PFGE paternine sahip bulunmuş ve pulstotip B olarak isimlendirilmiştir. Pulstotip B'de yer alan izolatların bir tanesi hariç hepsi (n= 9) yoğun bakımlardan izole edilmiştir. Bu izolatların çoğunluğu reanimasyon ünitesinden elde edilmiştir. Pulstotip B'de yer alan 10 izolatın tamamında bla_{OXA-48} gen varlığı görülürken, izolatların hiçbirinde bla_{NDM} ya da bla_{VIM} genlerinin varlığına rastlanmamıştır. Bu izolatların izolasyon tarihleri ve antibiyotik direnç paternleri de birbirine benzer olarak saptanmıştır. Tüm bu bulgular, İbni Sina Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde bla_{OXA-48} üreten *K.pneumoniae* izolatları ile ortaya çıkan muhtemel bir salgın olarak düşünülmüştür.

Karbapenemaz üreten izolatlar çoğunlukla hastane kökenli olmakla birlikte, toplum kökenli izolatlara da rastlanılmaktadır²⁹. bla_{KPC} üreten izolatlar çoğunlukla nozokomiyal

enfeksiyon etkeni izolatlar arasında tanımlanırken *bla*_{NDM} ve *bla*_{OXA-48} üretenlere hem nozokomiyal hem de toplum kaynaklı patojenler arasında rastlanabilmektedir³⁰.

Çalışmamızda polikliniğe başvuran beş hastadan gönderilen örneklerde KKG'lere rastlanmıştır. Bunlardan üçü idrar örneği olup her birinde *bla*_{OXA-48} geni pozitif *K.pneumoniae* tanımlanmıştır. Diğer ikisi ise yara örneği olup birinde *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} genleri birlikte pozitif olan *K.pneumoniae* izolatı, diğerinde yine *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} birlikteliği gösteren *E.cloacae* izolatı tanımlanmıştır. İdrar örneklerinden izole edilen OXA-48 pozitif *K.pneumoniae*'lerden biri PFGE analizinde pulsotip A ile uyumlu bulunmuş olup hastanın kısa zaman önce prostatektomi operasyonu öyküsü olduğu belirlenmiştir. Bu durum izolatin hastanede yatış sırasında kazanıldığını düşündürmüştür. İdrar örneklerinin alındığı diğer iki hastadan birinin yakın zamanda hastaneye yatış öyküsü bulunmaması, diğerinin ise altı ay öncesine ait tiroidektomi operasyonu öyküsü dışında hastaneye yatış öyküsü bulunmaması nedeniyle bu izolatların toplum kökenli KKG pozitif izolatlar olduğu düşünülmüştür. Yara örneklerinin alındığı iki hastanın ise yakın dönemde ortopedi kliniğine yatış ve cerrahi girişim öyküleri olduğu anlaşılmıştır. Bu hastaların enfeksiyon etkeni olan izolatlarının hastane kökenli olabileceği değerlendirilmiştir. Tüm bu bulgular, OXA-48 üreten bakterilerin endemik olduğu ülkemizde karbapenemaz üreticisi *Enterobacteriaceae* üyelerinin etken olduğu hastane kökenli enfeksiyonların yanı sıra toplum kökenli enfeksiyonların da karşımıza çıkabileceğini düşündürmüştür.

Çalışmamızdan elde ettiğimiz verilere göre, bölgemizde *bla*_{OXA-48} üreten izolatlar sıklığını korumaktadır. Metallo-beta-laktamazlar arasında *bla*_{VIM} geninin yaygınlığı ve *bla*_{OXA-48} geni ile birlikteliği dikkat çekmektedir. *bla*_{NDM} üreten izolatlara ise henüz çok sık rastlanmamaktadır. Karbapenemaz üreten bakterilerin neden olduğu hastane salgınları konusunda dikkatli olmak gereklidir. Ayrıca, ülkemiz gibi belirli bir KKG'nin yaygın olduğu bölgelerde, uzun süreli tedaviye rağmen düzelmeyen toplum kökenli enfeksiyonlarda, karbapenemaz üreten etkenlerin sorumlu olabileceği akla getirilmelidir.

TEŞEKKÜR

KKG pozitif Euscape izolatları için Sayın Dolunay Gülmez Kıvanç'a, Sayın Aslı Çakar'a, nadir KKG pozitif klinik örnek izolatları için Jülide Sedef Göçmen'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Nordmann P, Cornaglia G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 411-2.
2. Budak S, Aktaş Z, Erdem H. Enterik gram-negatif bakterilerde laboratuvaradan kliniğe karbapenemazlar. Mediterr J Infect Microb Antimicrob 2012; 1: 1-11.
3. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. Int J Antimicrob Agents 2010; 36 (Suppl 3):S8-14.
4. CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-fifth Informational Supplement, Document M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2014. Wayne, PA.
5. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70(1): 119-23.

6. Centers for Disease Control and Prevention. Standard operating procedure for PulseNetPFGE of *Escherichia coli* O157: H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. <http://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/ecoli-shigella-salmonella-pfge-protocol-508c.pdf>. Accessed January 8, 2015.
7. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2013; 68(3): 487-9.
8. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1211-33.
9. Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(1): 15-22.
10. Carrër A, Poirel L, Eraksoy H, Cagatay AA, Badur S, Nordmann P. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52(8): 2950-4.
11. Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauerfeind A. Carbapenem-Hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. Chemotherapy 2008; 54(2): 101-6.
12. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J Antimicrob Chemother 2012; 67(7): 1597-606.
13. Van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Virulence 2016; 11: 1-10.
14. Alp E, Percin D, Colakoglu S, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey. J Hosp Infect 2013; 84(2):178-80.
15. Azap O, Otlu B, Yesilkaya A, Yakupogullari Y. Detection of OXA-48-like Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology. Balkan Med J 2013; 30(2):259-60.
16. Demir Y, Zer Y, Karaoglan I. Investigation of *VIM*⁺ IMP, NDM-1, KPC and OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains. Pak J Pharm Sci 2015; 28(3 Suppl):1127-33.
17. Kilic A, Aktas Z, Bedir O, et al. Identification and Characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Turkey. Ann Clin Lab Sci 2011; 41(2): 161-6.
18. 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. J Chemother 2017; 9: 1-7.
19. Zarakolu P, Eser OK, Aladag E, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization: a surveillance study at a Turkish university hospital from 2009 to 2013. Diagn Microbiol Infect Dis 2016; 85(4): 466-70.
20. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariola A, et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM} a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43(7): 1584-90.
21. Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. Korean J Intern Med 2012; 27(2): 128-42.
22. Yildirim I, Ceyhan M, Gur D, Mugnaioli C, Rossolini GM. First detection of *VIM*-1 type metallo-beta-lactamase in a multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate from Turkey also producing the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase. J Chemother 2007; 19(4): 467-8.
23. Yong D, Toleman MA, Giske CG, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53(12): 5046-54.
24. Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56(5): 2784-5.
25. Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother 2013; 68(1): 84-8.

26. Ducomble T, Fauchaux S, Helgig U, et al. Large hospital outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*: investigating mortality and the impact of screening for KPC-2 with polymerase chain reaction. J Hosp Infect 2015; 89(3): 179-85.
27. Semin-Pelletier B, Cazet L, Boriqault C, et al. Challenges of controlling a large outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a French university hospital. J Hosp Infect 2015; 89(4): 248-53.
28. Carrër A, Poirel L, Yılmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54(3): 1369-73.
29. Cantón R, Akova M, Carmeli Y, et al. Rapid evaluation and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. Clin Microbiol Infect 2012; 18(5): 413-31.
30. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clin Microbiol Infect 2014; 20(9): 821-30.