






## Klebsiella pneumoniae Suşlarında OXA-48 ve Alt Türevlerinin Araştırılması ve Fenotipik Yansıma

### The Investigation of OXA-48 and Sub-Derivatives in Klebsiella pneumoniae Strains and Phenotypic Reflection

Arzu Uyanık Parlak   
Hüseyin Güdücüoğlu   
Mehmet Parlak   
Yasemin Bayram   
Barış Otlu 

#### öz

Hastane enfeksiyonları içinde karbapenem dirençli Gram negatif bakterilerin etken olduğu enfeksiyonların sayısı giderek artmaktadır. Bu bakteriler genellikle diğer grup antibiyotiklere de dirençli olduklarından dolayı sağlık için ciddi bir tehdit oluşturmaktadırlar. Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen Klebsiella pneumoniae izolatlarında OXA-48 ve alt türevlerinde karbapenemaz direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi ve direnç gözlenmeyen izolatlarda genotipik olarak OXA-48 gen bölgesinin var olup olmadığının araştırılması hedeflenmiştir.

Çalışmaya Mart 2015-Mart 2016 yılları arasında polikliniklere başvuran veya çeşitli servis ve yoğun bakım ünitelerinde tedavi gören hastalardan izole edilen 127 K.pneumoniae izolatı dâhil edilmiştir. BD Phoenix otomatize sistemiyle identifikasyonu ve antibiyogramı yapılan izolatların antibiyotiklere duyarlılıklarını Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemiyle de tespit edilmiştir. OXA-48 tipi enzimlerin varlığını gösterdiği kabul edilen temosilin diski ile fenotipik olarak direnç varlığına bakılmıştır. Tüm izolatlarda "in-house" polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile OXA-48 tipi enzimin varlığı araştırılmış ve pozitif saptanan izolatlar DNA dizi analizi yapılarak OXA-48 varyant varlığına bakılmıştır.

Karbapenem direnç oranı % 35 ve GSBL pozitifliği ise % 46 olarak tespit edilmiştir. Temosilin disk yönteminin K.pneumoniae suşlarında OXA-48 gen varlığını saptamadaki duyarlılığı % 88; özgüllüğü % 89 olarak bulunmuştur. OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi için en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir. Otomatize sistemle karbapenemlere dirençli olarak tespit edilen K.pneumoniae izolatlarında bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi varlığı % 80 bulunmuştur. OXA-48 pozitif olarak saptadığımız 42 izolatla yapılan DNA dizi analizi ile elde edilen tüm dizilerin OXA-48 olduğu ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir. Genotipik olarak OXA-48 gen bölgesine sahip üç izolatta direnç fenotipik olarak yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmadığı gözlenmiştir.

Karbapenemlere dirençli K.pneumoniae izolatlarındaki bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi varlığı yaygındır. Bunun yanında OXA-48 gen bölgesine sahip bazı izolatlarda direnç fenotipik olarak yansımasının hemen ortaya çıkmaması nedeniyle tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulmalıdır.

**Anahtar kelimeler:** fenotipik yansıma, karbapenem, K.pneumoniae, OXA-48

#### ABSTRACT

The number of infections caused by carbapenem-resistant Gram negative bacteria is increasing among nosocomial infections. These bacteria are a serious threat to health because they are usually resistant to other antibiotics. This study was aimed to determine the carbapenemase resistance of OXA-48 and its sub-derivatives in Klebsiella pneumoniae isolates isolated from various clinical samples by phenotypic and genotypic methods and to investigate the presence of OXA-48 gene region genotypically in isolates without resistance.

A total of 127 K.pneumoniae strains isolated from patients treated in various clinics and intensive care units were included in this study from March 2015 to March 2016. The isolates were identified and susceptibilities were tested using BD Phoenix automated system and also with Kirby-Bauer disk diffusion method. The presence of resistance was examined phenotypically with the disk of temosillin, which is considered to indicate the presence of OXA-48 type enzymes. The presence of OXA-48 type enzyme was investigated by "in-house" polymerase chain reaction (PCR) in all isolates and the presence of OXA-48 variant was investigated by DNA sequencing analysis on positive isolates.

Karbapenem resistance rate was 35 % and ESBL positivity was determined as 46 %. The sensitivity of temocillin disk method in the identification of OXA-48 gene presence in K. pneumoniae strains was found to be 88 %, and specificity 89 %. Ertapenem was the best carbapenem with sensitivity and specificity balance to detect carbapenem resistance caused by OXA-48. The presence of bla<sub>OXA-48</sub> gene region was 80 % in K. pneumoniae isolates detected as resistant to carbapenems by an automated system. All sequences obtained by DNA sequence analysis of 42 OXA-48 positive isolates were OXA-48 and there was no variant OXA-48 gene among the sequences. It was observed that the phenotypic reflection of resistance did not occur immediately in three isolates genotypically having OXA-48 gene region.

The presence of bla<sub>OXA-48</sub> gene region in carbapenem-resistant K.pneumoniae isolates is common. In addition, in some isolates having OXA-48 gene region, should be kept in mind in patients who do not recover despite treatment, due to phenotypic reflection of resistance does not occur immediately.

**Keywords:** carbapenem, K.pneumoniae, OXA-48, phenotypic reflection

Received/Geliş: 07.10.2020

Accepted/Kabul: 22.02.2021

Published Online/Online Yayın: 29.04.2021

**Atf/Cite as:** Uyanık Parlak A, Güdücüoğlu H, Parlak M, Bayram Y, Otlu B. Klebsiella pneumoniae suşlarında OXA-48 ve alt türevlerinin araştırılması ve fenotipik yansıma. ANKEM Derg. 2021;35(1):1-8.

**Mehmet Parlak**

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Van, Türkiye

✉ mehmetparlak65@hotmail.com

ORCID: 0000-0001-6030-2244

**A. Uyanık Parlak** 0000-0003-1048-8268

Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve

Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma

Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı,

Ankara, Türkiye

**H. Güdücüoğlu** 0000-0003-1048-8268

**Y. Bayram** 0000-0001-6083-5550

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji

Anabilim Dalı,

Van, Türkiye

**B. Otlu** 0000-0002-6220-0521

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi,

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,

Malatya Türkiye

## GİRİŞ

*Klebsiella* cinsi bakteriler, tedavi edilmediğinde yüksek ölüm oranlarına sahip toplum kaynaklı bakteriyel pnömoni etkeni olabilmektedir. Nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu esas bakteri *Klebsiella pneumoniae* olup, bu cinsin medikal olarak en önemli türüdür. İnsanların nazofarinksinde ve intestinal sisteminde saprofit olarak bulunmaktadır. Dışkı örneklerinde tespit oranı % 5 ile % 38 arasında değişirken, nazofarenkste oranlar % 1 ile % 6 arasında değişmektedir. Bu taşıyıcılık oranları, kolonizasyon oranlarının kalış süresiyle doğru orantılı olarak arttığı hastane ortamında büyük ölçüde değişir.

Hastanede yatan hastalarda bildirilen taşıyıcı oranları dışkıda % 77, farinkste % 19 ve hastaların ellerinde % 42'dir<sup>(19)</sup>.

Bu yüzyılın başlarından itibaren genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL), *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızla yayılmıştır. Son yıllarda bu yayılım kontrolden çıkmış ve toplum kaynaklı enfeksiyonlar olarak karşımıza çıkmaya başlamıştır. GSBL üreten *K.pneumoniae* enfeksiyonlarında kullanılacak az sayıdaki etkili ajanlar arasında en güvenilir olanı ise karbapenemlerdir. Karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatlarının ortaya çıkışı hem tedavi seçeneklerini kısıtlamakta hem de morbidite ve mortaliteyi artırmaktadır. Ayrıca karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri, tigesiklin ve polimiksin dışındaki ajanlara karşı dirence sahip olduklarından ciddi bir tehdit oluşturmakta ve dikkatle takip edilmeleri gerekmektedir<sup>(2,16)</sup>.

Karbapenemazlar, fonksiyonel sınıflamada grup 2d, 2f ve 3'te, Ambler moleküler sınıflamada ise A, B ve D sınıfı içerisinde bulunmaktadır. Sınıf D içerisinde OXA enzimleri bulunmaktadır<sup>(1)</sup>. Bu gruptan OXA-48 ilk olarak ülkemizde, İstanbul'da karbapenem dirençli bir *K.pneumoniae* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolat ayrıca sınıf A GSBL olan SHV-2a, dar spektrumlu beta-laktamaz TEM-1 ve OXA-47'yi bulundurmaktadır. OXA-48 beta-laktamazı penisilinleri ve penisilinlerden daha düşük düzeyde imipenemi hidrolize etmektedir fakat geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı aktif değildir. Bu enzim, imipenem için bilinen en yüksek katalitik aktiviteye sahip sınıf D beta-laktamazdır. Diğer sınıf D beta-laktamazları ile olan aminoasit benzerliği % 46'dan daha azdır ve OXA-23 ve OXA-40 ile zayıf benzerliğe sahiptir (sırasıyla % 36 ve % 32)<sup>(20)</sup>.

Çalışmamızda; çeşitli klinik örneklerden izole edilen *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 tipi (OXA-48 ve varyantların) karbapenemaz direncinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle belirlenmesi fenotipik olarak karbapenem direnci göstermeyen izolatların direnç genlerine sahip olup olmadığının tespit edilmesi ve ülkemize ait epidemiyolojik verilere katkı sağlamak amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Örneklerin Toplanması:

Çalışma, Mart 2015-Haziran 2016 tarihleri arasında Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmaya çeşitli klinik örneklerden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiş ve Phoenix100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi ile karbapenemlere duyarlı, orta dirençli veya dirençli olarak belirlenen 127 *K.pneumoniae* izolatı dahil edilmiştir. Bir hastadan birden fazla izolat çalışmaya dahil edilmiştir.

Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen klinik örnekler % 5 koyun kanlı agar (RTA, Türkiye) ve Eozin Metilen Mavisı agar (Oxoid, İngiltere) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Gram boyama ile Gram negatif basil morfolojisinde olan tüm izolatların tür tanımlanması otomatize Phoenix 100 bakteri tanımlama sistemi ile yapılmıştır. *K.pneumoniae* olarak tanımlanan izolatlar -80°C'de derin dondurucuda (Sanyo, Japonya) saklanmıştır.

Tüm izolatlar için antibiyotik duyarlılık testleri ve GSBL tespiti Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ve Phoenix100 (Becton Dickinson, ABD) otomatize sistemi panelleri kullanılarak yapılmıştır. Sonuçlar 2015 yılında Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ve 2016 yılında ise European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirilmiştir<sup>(8,24)</sup>.

Temosilin disk difüzyon testi için plaklara 30 µg temosilin (Mast Diagnostics, Merseyside, Birleşik Krallık) içeren antibiyotik diski yerleştirilip 35-37°C'de 18-24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. İnhibisyon zon çapı ≤10 mm ise yüksek temosilin direnci olarak değerlendirilmiştir.

### Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR):

Bu yöntemle *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 ve varyantı olan (OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232) karbapenemaz direnç geni varlığı araştırılmıştır. DNA izolasyonunda Exgene™ Clinic SV Mini kit (GeneAll, Güney Kore) kullanılmıştır. Kullanılan primerler Monteiro ve ark.'nın<sup>(15)</sup> çalışmasından alınmıştır (Tablo 1).

**Tablo 1. Karbapenemaz genlerinin saptanması amacıyla kullanılan primer dizileri.**

Gen	Primer	Sekans(5'-3')	Kaynak
bla <sub>OXA-48</sub>	OXA-48-F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	10
	OXA-48-R	GTAAMRATGCTTGGTTCGC	
OXA-48A		TTGGTGGCATCGATTATCGG	13
OXA-48B		GAGCACTTCTTTGTGATGGC	

Amplifikasyon için SensoQuest Labcycler (SensoQuest Biomedizinische, Almanya) cihazı kullanılmıştır. İzole edilen DNA ile Taq DNA polimeraz (Geneall, Güney Kore) kitinin önerisi doğrultusunda reaksiyon karışımı hazırlanmıştır.

#### OXA-48 ve Diğer Varyantların Tespiti:

Bakteriyel DNA izolasyonu, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen-Hilden, Almanya) ile yapılmıştır. PCR ile OXA-48-like gen bölgesinin çoğaltılması aşamasında bilinen tüm bla OXA-48-like genlerinin amplifikasyonu için kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir. PCR sonrasında ürünlerin % 1,5'lük agaroz jelde, 1X TBE tamponunda 1 saat elektroforez yapılmıştır. Elektroforez işlemi sonrası oluşan bantlar jel görüntüleme sisteminde (Gel logic 2200 imaging system, Kodak Company, NY, ABD) görüntülenmiştir. 743bp büyüklüğündeki bantlar OXA-48-like geni pozitif olarak değerlendirilmiştir.

#### PCR ürünlerinin dizileme için saflaştırılması:

PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünleri, DNA saflaştırma işlemine alınmıştır. Bu amaçla ticari bir saflaştırma kiti (Qiaquick PCR purification Kit, Qiagen, Almanya) kullanılmıştır. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda uygulanan protokol uygulanmıştır. İşlem sonunda elde edilen ürünlerin saflığı % 1,5'lük agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve yeterli miktarda DNA içeren saflaştırılma ürünleri sekans reaksiyonunda kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu; çift yönlü olarak her iki primerle yapılmıştır. Döngüsel dizileme için amplifikasyon koşulları 45 döngü boyunca 96°C'de 10 saniye, 50°C'de 5 saniye ve 60°C'de 4 dakika olarak uygulanmıştır (Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, ABD).

#### Sonuçların Analizi:

Dizileme sonuçlarını içeren kromatogram dosyaları FinchTV v1.3.1 yazılımına (GeoSpiza Inc., ABD) aktarılarak, diziler görsel olarak incelenmiş ve gerekli

görülen düzeltmeler yapılmıştır. Suşların elde edilen OXA-48-like gen dizileri Ugene yazılımı kullanılarak (<http://ugene.unipro.ru>), tüm diziler hizalanmıştır. Bunun yanında OXA-48 tipini (varyantını) belirlemek için National Centre for Biotechnology Information (NCBI) içinde yer alan GenBank ve Nucleotide ve Protein BLAST (Basic Local Alignment Tool) sunucuları kullanılmıştır.

## BULGULAR

Çalışmaya, her biri ayrı hastalardan izole edilen 47 adet karbapenem dirençli ve 80 adet karbapenem duyarlı olmak üzere 127 *K.pneumoniae* izolatu dahil edilmiştir. Çalışmaya alınan izolatların 77'si (% 60,6) erkek, 50'si (% 39,4) kadın hastalardan izole edilmiştir. Hastaların 58'i polikliniklere başvuru yapan hastalardan, 69'u ise farklı servis ve yoğun bakım ünitelerinde takip edilen hastalardan oluşmaktadır. İzolatlar en fazla sırasıyla pediatri (% 47), anestezi (% 16), üroloji (% 10) ve dahiliyeden (% 9) elde edilmiştir. Örneklerin çoğunluğunu idrar örnekleri oluştururken (% 66), bunu sırasıyla kan (% 17), yara (% 5) ve solunum yolu örnekleri (% 3) takip etmiştir. İzolatların antibiyotiklere duyarlılık sonuçları Tablo 2'de verilmiştir.

**Tablo 2. *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karbapenemlere duyarlılık test sonuçları.**

Antibiyotik	Phoenix (MİK)				Disk Difüzyon			
	n	S	I	R (%)	n	S	I	R (%)
Ertapenem	122	76		44 (36,1)	127	86	6	35 (27,6)
İmipenem	121	90	12	19 (15,7)	127	87	7	33 (26,0)
Meropenem	122	97	5	20 (16,4)	127	90	6	31 (24,4)

S: Duyarlı

I: Duyarlı, yüksek doz

R: Dirençli

*K.pneumoniae* izolatlarının % 35'inde karbapenemlerden en az birine karşı direnç olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 127 *K.pneumoniae* izolatının 58'i (% 46) GSBL pozitif olarak saptanmıştır. Fenotipik olarak temosilin disk difüzyon testi sonucuna göre 46 (% 36) izolatta temosilin direnci saptanmıştır. İzolatların 42'sinde (% 33) bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi varlığı tespit edilmiş (Şekil 1), bunların 38'inde otomatize sistemle yapılan MİK sonuçlarına göre ertapenem,

imipenem veya meropenemden birine direnç saptanmıştır. Diğer üç izolatta ise herhangi bir karbapeneme direnç belirlenmemiştir (Tablo 3). bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi varlığı tespit edilen 38 izolatin 35'inde (% 92) sefalosporin direnci (sefotaksim, seftazidim, sefepim) tespit edilmiştir.

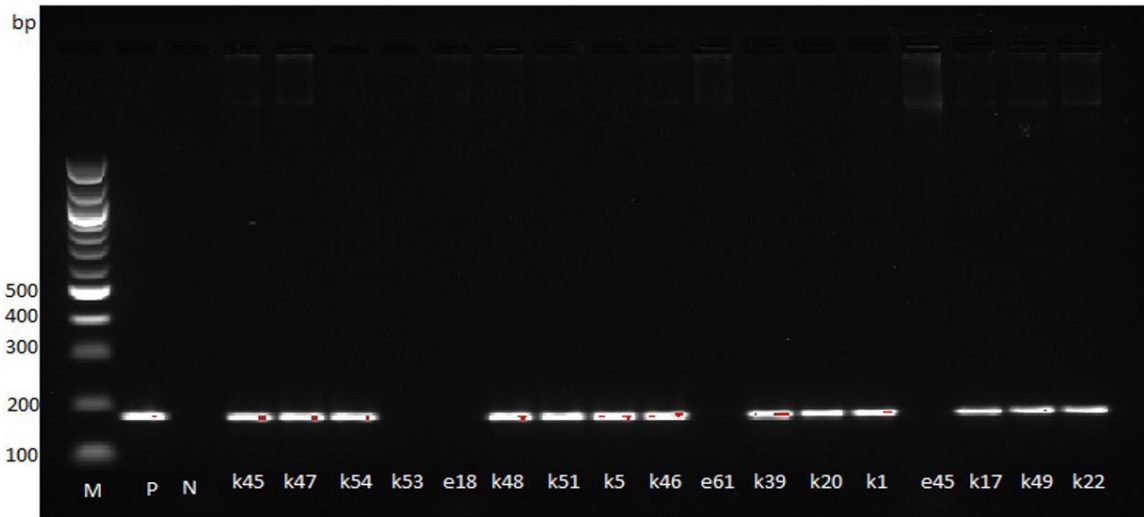
**Tablo 3.** Çalışmaya alınan izolatlarda OXA-48 geni varlığı ile izolatların; ertapenem, imipenem, meropenem ve temosilin duyarlılık sonuçlarının karşılaştırılması.

Değer		OXA-48		Toplam
		Pozitif	Negatif	
Karbapenemlerden herhangi birine (Ertapenem İmipenem Meropenem)	R	38	10	48
	S/I	4	75	79
	<b>Toplam</b>	<b>42</b>	<b>85</b>	<b>127</b>
Ertapenem	R	34	10	44
	S/I	4	74	78
	<b>Toplam</b>	<b>38</b>	<b>84</b>	<b>122</b>
İmipenem	R	15	3	18
	S/I	23	80	103
	<b>Toplam</b>	<b>38</b>	<b>83</b>	<b>121</b>
Meropenem	R	16	4	20
	S/I	22	80	102
	<b>Toplam</b>	<b>38</b>	<b>84</b>	<b>122</b>
Temosilin	R	37	9	46
	S/I	5	76	81
	<b>Toplam</b>	<b>42</b>	<b>85</b>	<b>127</b>

S: Duyarlı

I: Duyarlı, yüksek doz

R: Dirençli



M, marker; P, pozitif kontrol; N, negatif kontrol; bp, base pair; k52, k42....., suş kodları

Şekil 1. *K.pneumoniae* izolatlarında OXA-48 pozitif gen bölgeleri.

Karbapenemler ve temosilin diski sonuçlarına göre OXA-48 saptanması için duyarlılık ve özgüllük Tablo 4'te özetlenmiştir.

**Tablo 4.** Ertapenem, imipenem, meropenem ve temosilin için duyarlılık ve özgüllük sonuçları.

Antibiyotik	Duyarlılık	Özgüllük	PPD	NPD	Doğruluk
Ertapenem	89	88	77	95	89
İmipenem	39	96	83	78	79
Meropenem	42	95	80	78	78
Temosilin	88	89	80	94	89

Çalışılan 127 örnekten 42'sinde OXA-48-like geni pozitif bulunmuştur. PZR ürünlerinin dizi analizi, yüksek oranda benzerlik olduğunu ortaya çıkarmıştır. Farklıklar dizilemenin stabil olmadığı ilk ve son okumalarda gözlenmiştir. Dizilerin global hizalamaları değerlendirildiğinde tümünün OXA-48 olduğu (E value: 0.0, Ident.  $\geq$  99) ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir.

## TARTIŞMA

*Klebsiella* izolatlarının izole edildiği klinik örneklerin dağılımı çeşitli çalışmalarda değişiklik göstermektedir. Temiz ve ark.'nın<sup>(23)</sup> yaptıkları çalışmada *Klebsiella* spp. izolatlarını sıklık sırasıyla % 41 idrar, % 24 kan, % 16 trakeal aspirat, % 15 yara ve % 4 diğer klinik örneklerinden izole etmişlerdir. Çalışmamızda da izolatların literatürle benzer klinik örneklerden

izole edildiği belirlenmiştir.

*Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenem direnci 2000 yılından önce ihmal edilebilir bir olgu olarak görülmekteydi. Bu durum 1990'ların sonlarında *K.pneumoniae*'nin KPC-tipi karbapenemaz üretmesinin görülmesi ile değişmiştir ve 2000'li yıllarda tüm dünyaya yayılmıştır. Bunu NDM-tipi karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* ve OXA-48-tipi karbapenemaz üreten *K.pneumoniae*'lerin ortaya çıkması izlemiştir<sup>(5)</sup>.

CLSI ve EUCAST karbapenemaz üretiminin saptanması için farklı tarama önerileri sunmaktadır. CLSI tarama için ertapenemi önermektedir. Ancak, EUCAST ertapenemi duyarlılığının yüksek olmasına karşın özgüllüğünün düşük olmasından dolayı tercih etmemektedir. Bunun yerine, karbapenemaz taramasında duyarlılık ve özgüllük dengesinin uyumlu olması nedeniyle meropenemi önermektedir<sup>(8,24)</sup>. Ortega ve ark.<sup>(18)</sup> çalışmalarında ertapenemin, OXA-48 üreten *E.coli* taraması için imipenem veya meropenemden daha duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Çakar ve ark.<sup>(4)</sup>'nin yaptıkları çalışmada OXA-48 enzimi içeren izolatların birçoğunu meropeneme duyarlı, ancak tamamı ertapeneme dirençli bulunmuş ve karbapenemaz taramasında ertapenemin en uygun antibiyotik olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda imipenem ve meropenemin özgüllüklerinin birbirine yakın olduğu (sırasıyla % 96 ve % 95) saptanmıştır. Ancak, her iki karbapenemin de duyarlılıkları düşük (sırasıyla % 39 ve % 42) bulunmuştur. Çalışmamızda OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir.

Zarakolu ve ark.<sup>(25)</sup> 2016'da yayınlanan çalışmalarında 279 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının 270'inde OXA-48 benzeri karbapenemaz tespit etmiş olup tüm izolatlarda temosiline direnç tespit etmişlerdir. Teethaisong ve ark.<sup>(22)</sup>'nin temosilin disk difüzyon yöntemi kullanarak yaptıkları çalışmada; temosilin diskinin meropenemin PBA veya EDTA ile yapılan sinerji testleri de negatif olduğu durumlarda OXA-48 varlığını saptamadaki duyarlılık ve özgüllüğünü % 100 olarak bulmuşlardır. Florian ve ark.<sup>(9)</sup> çalışmalarında OXA-48 benzeri karbapenemaz üreten tüm izolatlarında temosilin duyarlılığını % 100 özgüllüğünü ise % 43,9 olarak bulmuşlardır. Omnia ve ark.<sup>(17)</sup> 2017'de yaptıkları çalışmalarında temosilin diskinin OXA-48 varlığını saptamada duyarlılığını % 97,9 özgüllüğünü % 50 olarak saptamışlardır.

Çalışmamızda temosilin diskinin duyarlılığı % 88 özgüllüğü ise % 89 olarak bulunmuş olup OXA-48'in varlığını tespit etmek ve dışlamak için tek başına yeterli olmayacağı düşünülmektedir. (Tablo 4).

Haciseyitoglu ve ark.<sup>(11)</sup> çalışmalarında karbapenem dirençli 44 *K.pneumoniae* izolatın 33'ünde OXA-48 pozitifliği saptamışlardır. Ece ve ark.<sup>(6)</sup> karbapenem dirençli 14 *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmalarında tüm izolatlarda OXA-48 pozitifliği saptamışlardır. Yapılan çalışmalar ülkemizde OXA-48 üreticilerinin yaygın olduğunu göstermektedir<sup>(12,13)</sup>. Çalışmamızda otomatize sistemle karbapenemlerden en az birine dirençli olan 47 *K.pneumoniae* izolatının 38'inde (% 80) in-house PCR ile bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi tespit edilmiştir ve çalışmamız sonucunda bulduğumuz sonuç literatürle uyum göstermektedir. Karbapenemlere dirençli olan bu 38 izolatın genişlemiş spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç olması bu izolatlarda OXA-48 tipi enzimlerin yanısıra bir GSBL enziminin de olabileceğini düşündürmektedir. Karbapenem dirençli 38 izolatın 14'ünün tüm karbapenemlere (ertapenem, imipenem ve meropenem) dirençli olması bu izolatların ek olarak başka bir karbapenemaz geni taşınması veya dış membran porin defekti durumunu akla getirmektedir.<sup>(10)</sup>

Messaoudi ve ark.<sup>(14)</sup> 2020'de yayınlanan çalışmalarında 240 karbapenem dirençli *K.pneumoniae* izolatının 196'ında OXA-48 benzeri gen bulunmuştur ve içlerinden seçilen alt gruba ileri analiz yapılmış olup 27 *K.pneumoniae* izolatı arasında 10 ve 17 izolat, sırasıyla bla<sub>OXA-48</sub> ve bla<sub>OXA-204</sub> genlerini barındırmıştır. Erdem ve ark.<sup>(7)</sup> 2020'de yayınlanan 10 MDR *K.pneumoniae* izolatı ile yaptıkları çalışmalarında bir izolatlarında bla<sub>OXA-181</sub> geni tespit etmişlerdir. Çalışmamızda OXA-48 pozitif olarak saptadığımız 42 izolatla yapılan DNA dizi analizi ile elde edilen tüm dizilerin OXA-48 olduğu ve diziler içinde varyant OXA-48 geni bulunmadığı tespit edilmiştir.

Carrer ve ark.<sup>(2)</sup> çeşitli ülkelerden 18 OXA-48 pozitif klinik izolat (13 *K.pneumoniae*, 2 *Enterobacter cloacae*, 1 *Providencia rettgeri* ve 1 *Citrobacter freundii*) toplayarak yaptıkları çalışmada izolatların disk difüzyon ve gradient testi ile antibiyotiklere duyarlılıklarını incelemişlerdir. OXA-48 pozitif olan 18 izolatın 14'ü karbapenemlere dirençli iken dört tanesi orta duyarlı veya duyarlı olarak saptanmıştır. Cuzon ve ark.<sup>(3)</sup> 2008'de Türkiye dışındaki ilk OXA-48 vakasını yayınlamışlardır. Phoenix (Becton-Dickinson, Erembodegem, Belçika) ve VITEK (bioMérieux,



Fransa) ile izolat amoksisilin ve AMC'ye dirençli, geniş spektrumlu sefalosporinlere ve meropeneme duyarlı olarak bulunmuştur. Disk difüzyon ile imipenem ve meropenemin zon çaplarında azalma bulunurken ertapenem ise orta duyarlı olarak saptanmıştır. Gradient testi ile CLSI kriterlerine göre imipenem ve meropeneme duyarlı; aralığında ertapeneme ise orta duyarlı bulunmuştur. PCR ve sekans analizi ile bla<sub>OXA-48</sub> geni gösterilmiştir. Otomatize sistemlerin (Phoenix ve VITEK) karbapenem duyarlılığındaki azalmayı saptayamadığı ve bu yeni direnç mekanizmasının görüldüğünden daha yaygın olabileceği belirtilmiştir.

Çalışmamızda bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesini pozitif olarak saptadığımız üç izolatin otomatize sistemle belirlenen karbapenem MİK değerleri duyarlı sınırdadır bulunmuştur. Bu üç izolatin gradient test yöntemiyle de confirmasyonu yapılmış ve yine duyarlı aralıkta olduğu tespit edilmiştir. İzolatların elde edildiği üç hastanın da geçmişinde hastanede yatış öyküsü bulunmaktadır. İki hastanın bakteriler izole edilmeden öncesinde ve sonrasında karbapenem tedavisi alıp almadıkları tespit edilememiştir. Son hasta ise izolat tespit edildikten sonra imipenem tedavisi almıştır ve tedaviye cevap vermiştir. OXA-48 pozitif olarak saptadığımız bir izolat ise otomatize sistemle ertapeneme dirençli tespit edilmiştir ancak gradient test yöntemiyle duyarlı olarak saptanmıştır. Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ve literatürdeki bilgiler ışığında OXA-48 tipi direncin genotipik olarak varlığının fenotipik yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmadığıdır ve böyle bir izolatla enfekte hastaların karbapenem tedavisine verdikleri cevap hakkındaki bilgilerimiz yetersiz kalmaktadır. OXA-48 tipi enzim üretiminin yaygın olduğu ülkemizde tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulmalıdır.

Sonuç olarak; hastanemizde izole edilen *K.pneumoniae* izolatları arasında karbapenem direnç oranı % 35 ve GSBL pozitifliği ise % 46 olarak tespit edilmiştir. Temosilin disk yönteminin *K.pneumoniae* suşlarında OXA-48 gen varlığını saptamadaki duyarlılığı % 88, özgüllüğü % 89 bulunmuştur ve literatürde bazı yayınlarda bahsedildiği kadar (% 100) yüksek olmadığı görülmüştür. OXA-48 varlığına bağlı gelişen karbapenem direncini saptamada duyarlılık ve özgüllük dengesi en iyi karbapenemin ertapenem olduğu gözlenmiştir. Otomatize sistemle karbapenemlere dirençli olarak tespit edilen *K.pneumoniae* izolatla-

rındaki bla<sub>OXA-48</sub> gen bölgesi varlığı % 80 olarak bulunmuştur ve bu durum ülkemizde OXA-48 üreticilerinin yaygın olduğunu göstermektedir. Fenotipik testlerle sınıf D β-laktamazların fenotipik testlerle kolayca belirlenememesi<sup>(20)</sup> genotipik olarak OXA-48 gen bölgesine sahip bazı izolatlarda direncin fenotipik olarak yansımasının doğrudan doğruya ortaya çıkmamasına neden olup tedaviye rağmen iyileşmeyen hastalarda bu tip izolatların olabileceği akılda tutulması gerekmektedir.

#### Teşekkür

Bu çalışma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı Araştırma Fonu tarafından 2015-TF-B295 proje olarak desteklenmiştir. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Başkanlığı'na teşekkür ederiz.

Moleküler testler, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Moleküler laboratuvarında yürütülmüş olup yakın zamanda aramızdan ayrılan Dr. Öğr. Üy. Nafia Canan GÜRSOY'u rahmetle anıyoruz.

**Etik Kurul Onayı:** Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Klinik Araştırma Etik Kurulu'nun 26.02.2015 tarih 06 no.lu etik kurul onayı alınmıştır.

**Çıkar Çatışması:** Yazarlar tarafından herhangi bir çıkar çatışması bildirilmemiştir.

**Ethics Committee Approval:** The approval of the Medicine Clinical Research Ethics Committee of Van Yüzüncü Yıl University dated 26.02.2015 and number 06 was obtained

**Conflict of Interest:** No conflict of interest was declared by the authors.

#### KAYNAKLAR

1. Bush K and Jacoby GA. Updated functional classification of β-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969-76. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
2. Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1369-73. <https://doi.org/10.1128/AAC.01312-09>
3. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Huang TD, Nordmann P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing β-lactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from

- Belgium. Antimicrob Agents Chemother 2008;52(9):3463-4.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00543-08>
4. Çakar A, Akyön Y, Gür D ve ark. Türkiye’de 2014 yılı içinde izole edilen karbapenem dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz varlığının araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2016;50(1):21-33.  
<https://doi.org/10.5578/mb.10695>
  5. Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(01):74-84.  
<https://doi.org/10.1055/s-0035-1544208>
  6. Ece G, Tunc E, Otlu B, et al. Detection of bla OXA-48 and clonal relationship in carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates at a tertiary care center in Western Turkey. J Infect Public Health. 2018;11(5):640-2.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2018.04.003>
  7. Erdem F, Abulaila A, Aktas Z, et al. In vitro evaluation of double carbapenem and colistin combinations against OXA-48, NDM carbapenemase-producing colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Resist Infect Control. 2020;9:70.  
<https://doi.org/10.1186/s13756-020-00727-4>
  8. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0. 2015. Erişim adresi:[<http://www.eucast.org>] Erişim tarihi:01/06/2016.
  9. Florian K, Stephan G, Martin K, et al. Comparison of Phenotypic Tests and an Immunochromatographic Assay and Development of a New Algorithm for Detection of OXA-48-like Carbapenemases. J Clin Microbiol. 2017;55(3):877-83.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.01929-16>
  10. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. Int J Antimicrob Agents. 2008;31(6):523-6.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2008.01.017>
  11. Haciseyitoglu D, Dokutan A, Abulaila A, et al. The First Enterobacter cloacae Co-Producing NDM and OXA-48 Carbapenemases and Interhospital Spread of OXA-48 and NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Turkey. Clin Lab. 2017;63(7):1213-22.  
<https://doi.org/10.7754/Clin.Lab.2017.170120>
  12. Kahraman EP, Toptan H, Otlu B ve ark. Karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında bla OXA-48 benzeri genlerin araştırılması. Mikrobiyol Bul. 2019;53(2):134-43.  
<https://doi.org/10.5578/mb.67914>
  13. Kutlu HH, Us E, Tekeli A. Bir Üniversite Hastanesinde 2010-2014 yılları arasında izole edilen Enterobacteriaceae türlerinin karbapenemaz genlerinin araştırılması ve moleküler epidemiyolojisinin belirlenmesi. Mikrobiyol Bul. 2018;52(1):1-12.  
<https://doi.org/10.5578/mb.66156>
  14. Messaoudi A, Haenni M, Bouallègue O, et al. Dynamics and molecular features of OXA-48-like-producing *Klebsiella pneumoniae* lineages in a Tunisian hospital. J Glob Antimicrob Resist. 2020;20:87-93.  
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.07.005>
  15. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother. 2012;67(4):906-9.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkr563>
  16. Nordmann P and Cornaglia G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):411-2.  
<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03795.x>
  17. Omnia A, Shaker, Howayda E, Gomaa, Shereen A, ElMasry, et al. Evaluation of Combined Use of Temocillin Disk and Mastdisks Inhibitor Combination Set Against Polymerase Chain Reaction for Detection of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. Open Access Maced J Med Sci. 2018;6(2):242-7.  
<https://doi.org/10.3889/oamjms.2018.090>
  18. Ortega A, Sáez D, Bautista V, et al. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. J Antimicrob Chemother. 2016;71(8):2131-8.  
<https://doi.org/10.1093/jac/dkw148>
  19. Podschun R and Ullmann U. *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microbiol Rev. 1998;11(4):589-603.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.11.4.589>
  20. Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54(1):24-38.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01512-08>
  21. Potron A, Nordmann P, Poirel L. Characterization of OXA-204, a carbapenem-hydrolyzing class D  $\beta$ -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(1):633-6.  
<https://doi.org/10.1128/AAC.01034-12>
  22. Teethaisong Y, Eumkeb G, Nakouti I, et al. A combined disc method with resazurin agar plate assay for early phenotypic screening of KPC, MBL and OXA-48 carbapenemases among Enterobacteriaceae. J Appl Microbiol. 2016;121(2):408-14.  
<https://doi.org/10.1111/jam.13196>
  23. Temiz H, Özbek E, Vural DG, Özekinci T. *Klebsiella* izolatlarının antimikrobiyal direnç oranlarının değerlendirilmesi. J Appl Microbiol. 2016;121(2):408-14.

24. Wayne PA. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Clinical and Laboratory Standards Institute:CLSI Document M100-S25, (2015).
25. 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.  
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.05.012>