

T.C.  
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLİSTİN DİRENÇLİ KARBAPENEMAZ ÜRETEN  
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE*'DA  
ANTİBİYOTİKLERİN SİNERJİSTİK  
AKTİVİTELERİNİN MALDI-TOF MS İLE  
BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağlar Yusuf YÜCEDAĞ**

**Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

**Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ**

**OCAK-2021**

**T.C.**  
**SAKARYA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLİSTİN DİRENÇLİ KARBAPENEMAZ ÜRETEN**  
***KLEBSIELLA PNEUMONIAE*'DA**  
**ANTİBİYOTİKLERİN SİNERJİSTİK**  
**AKTİVİTELERİNİN MALDI-TOF MS İLE**  
**BELİRLENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Çağlar Yusuf YÜCEDAĞ**

**Enstitü Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

**Enstitü Bilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji**

“Bu tez ....../....../2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği / Oyçokluğuile Kabul edilmiştir.”

<b>JÜRİ ÜYESİ</b>	<b>KANAATI</b>	<b>İMZA</b>
Prof. Dr. Mustafa ALTINDİŞ		
Prof. Dr. Devrim DÜNDAR		
Prof. Dr. Mehmet KÖROĞLU		

## BEYAN

Bu çalışma T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 16/09/2019 tarihinde 271 karar numarası ile onay alınmıştır. Çalışma için gerekli bütçe Sakarya Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler Koordinatörlüğü (BAP) tarafından karşılanmıştır. Bu araştırma tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanma sürecinden yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı bir davranışımın olmadığını, tez çalışmmdaki bütün bilgileri akademik ve etik kurallara uygun biçimde elde ettiğimi, tez çalışmamda elde edilemeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakların tamamını kaynaklar listesine aldığımı, bu tez çalışması ve yazımı sırasında telif ve patent haklarını ihlal edecek davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih:

.../.../2021

Adı-Soyadı

İmza

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	I
TEŞEKKÜR.....	V
KISALTMA VE SİMGELER.....	VI
ŞEKİLLER.....	IX
TABLolar.....	X
RESİMLER.....	XII
ÖZET.....	XIII
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>ENTEROBACTERALES</i> .....	6
2.1.1. Sınıflandırma.....	6
2.2. <i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	8
2.2.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri.....	9
2.2.2. Epidemiyolojisi ve Yaptığı Enfeksiyonlar.....	9
2.2.3. <i>E. coli</i> Enfeksiyonlarının Tedavisi.....	10
2.3. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIA</i> .....	10
2.3.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri.....	10
2.3.2. Epidemiyolojisi ve Yaptığı Enfeksiyonlar.....	11

2.3.3. <i>K. pneumoniae</i> İnfeksiyonunda Antibiyotik Tedavisi .....	12
2.4. BETA-LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLER .....	12
2.4.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları .....	13
2.5. ANTİBİYOTİK KOMBİNASYON TEDAVİLERİ .....	21
2.5.1. Kombinasyon Tedavisi Kullanma Nedenleri .....	21
2.6. MALDI-TOF MS .....	22
2.6.1. MALDI-TOF MS ile Antimikrobiyal Duyarlılık ve Direnci Testi .....	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM .....	27
3.1. ÇALIŞMA GRUBU VE ÖRNEKLER .....	27
3.2. İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ .....	28
3.2.1. İdentifikasyon.....	28
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi .....	29
3.2.3. Suşların Toplanması ve Bakterilerin İzolasyonu .....	29
3.3. SUŞLARIN İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VITEK®2 İLE TANIMLANMASI .....	31
3.4. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMİ .....	34
3.4.1. Real Time PCR .....	34
3.5. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ VE SİNERJİ ÇALIŞMASI .....	34
3.5.1. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu ile Antibiyotik Duyarlılık Testi .....	34
3.5.2. Checkerboard Yöntemi .....	39
3.5.3. Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS İçin Örnek İşleme Yöntemi .....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1. HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN BULGULAR .....	45
4.2. SUŞLARIN İZOLE EDİLDİĞİ KLİNİKLERE GÖRE ÖRNEK TÜRLERİ VE	

BULGULAR.....	46
4.3. CHECKERBOARD ile KOLİSTİN ve MEROPENEM ETKİLEŞİMİ .....	47
4.4. CHECKERBOARD ile KOLİSTİN VE RİFAMPİSİN ETKİLEŞİMİ .....	49
4.5. MALDI-TOF MS ANALİZİ VE VERİLER .....	51
5. TARTIŞMA VE SONUÇ .....	56
KAYNAKLAR .....	62
EKLER.....	77
ÖZGEÇMİŞ .....	79

## TEŞEKKÜR

Sakarya Üniversitesi yüksek lisans süresi boyunca her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, hoő görüsü, öneri ve eleştirileriyle beni yönlendiren, tez planlaması süresince bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşarak yardımcı olan tez danışmanım değerli hocam sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ'e, araştırma tezi çalışmalarım boyunca laboratuvar teknik desteklerinden dolayı hocam Prof. Dr. Mehmet KÖROğLU'na, desteğini her zaman, her konuda hissettiğim sayın Uzm. Dr. Hande TOPTAN'a, laboratuvar çalışmalarım süresince her türlü bilgiyi ve yardımını esirgemeyen Arő. Gör. Dr. Mehmet ÖLMEZ, Arő. Gör. Tuğba AYHANCI ve Arő. Gör. Dr. Hüseyin HATIPOğLU'na, yaőamım boyunca sevgisini ve desteklerini hep yanımda hissettiğim değerli annem Gülcan YÜCEDAğ'a ve kıymetli babam MEHMET YÜCEDAğ'a, canımdan öte kardeőlerim Dilan YÜCEDAğ'a, Harun YÜCEDAğ'a ve Muhammed Emre YÜCEDAğ'a, bana olan inancı ve destekleri için teőekkürlerimi sunarım.

Saygılarımla

## KISALTMA VE SİMGELER

AG	: Aminoglikozit
$\beta$ -L	: Beta - Laktam
BDM	: Broth mikrodilusyon
CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CS	: Kolistin
dk	: Dakika
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
EHEC	: Enterohemorajik <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvazif <i>E. coli</i>
EMB	: Eosin Metilen Blue
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FİK	: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu



FİKİ	: Fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi
GİM	: German imipenemase
GSBL	: Geniş Spektrumlu $\beta$ -Laktamaz
İMP	: İmipenemase
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
KİN	: Kinolon
KL	: Kloramfenikol
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LA	: Linkozamit
MALDI-TOF MS	: Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon İyonizasyon -Uçuş Zamanı Kütle Spektrometrisi
MBL	: Metallo $\beta$ -Laktamaz
MDR/ÇİD	: Multi Drug Resistant/Çoklu ilaca dirençli
MEM	: Meropenem
mg	: Miligram
MHA	: Mueller Hinton Agar
MHB	: Mueller Hinton Broth
MIK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
ml	: Mililitre
ML	: Makrolit
mm	: Milimetre
NDM	: New Delhi metallo $\beta$ -Laktamaz
OXA	: Oxacillin

POL	: Polimiksin
PCR	: Polimerase Chain Reaction
RIF	: Rifampisin
SME	: Serratia marcescens
SUL	: Sulfonamid
TET	: Tetrasiklin
TMP	: Trimetoprim
VAN	: Vankomisin
VIM	: Verona integron mediated metallo $\beta$ -Laktamaz
Zn	: Çinko
$\mu$ l	: Mikrolitre
$\mu$ m	: Mikrometre

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.</b> Antibiyotik hedefleri ve direnç mekanizmaları .....	13
<b>Şekil 2.</b> MALDI-TOF kütle spektrometrisi .....	23
<b>Şekil 3.</b> MALDI slaytı ve TOF borusundan oluşan MALDI-TOF MS. ....	24
<b>Şekil 4.</b> Karbapenemaz türüne göre suşların sayısal dağılımı .....	31
<b>Şekil 5.</b> Suşların VITEK® 2 otomatize sisteme göre antibiyotik duyarlılık grafiği...33	
<b>Şekil 6.</b> Sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematize edilmiş görüntüsü .....	37
<b>Şekil 7.</b> MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + meropenem) etkileşiminde sinerji pozitif tespiti .....	52
<b>Şekil 8.</b> MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + meropenem) etkileşiminde sinerji negatif tespiti .....	53
<b>Şekil 9.</b> MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + rifampisin) etkileşiminde sinerji pozitif tespiti.....	54
<b>Şekil 10.</b> MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + rifampisin) etkileşiminde sinerji negatif tespiti.....	55

## TABLULAR

<b>Tablo 1.</b> Antibiyotik direncinin mekanizmaları .....	5
<b>Tablo 2.</b> <i>Enterobacterales</i> ailesinin sınıflandırması .....	7
<b>Tablo 3.</b> <i>E. coli</i> 'nin virülans faktörleri.....	10
<b>Tablo 4.</b> Beta-laktam grubu antibiyotikler .....	12
<b>Tablo 5.</b> Beta-laktamazların fonksiyonel ve moleküler sınıflandırması .....	15
<b>Tablo 6.</b> Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri .....	16
<b>Tablo 7.</b> Çalışmamızda kullanılan suşların genotipik özellikleri .....	30
<b>Tablo 8.</b> Suşların VITEK® 2 otomatize sistemine göre antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	33
<b>Tablo 9.</b> Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin sınır MİK değerleri (µg/ml).....	38
<b>Tablo 10.</b> Suşların broth mikrodilüsyon MİK değerleri.....	38
<b>Tablo 11.</b> Kolistin / meropenem kombinasyonu için Checkerboard çalışmasındaki örnek bir mikroplak planı .....	40
<b>Tablo 12.</b> Kolistin/rifampisin kombinasyonu için Checkerboard çalışmasındaki örnek bir mikroplak planı .....	41
<b>Tablo 13.</b> Suşların izole edildiği hastaların cinsiyet dağılımı.....	45
<b>Tablo 14.</b> Karbapenemlere dirençli <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımları.....	46

<b>Tablo 15.</b> Karbapenemlere dirençli <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının kliniklere göre dağılımları.....	46
<b>Tablo 16.</b> Kolistin ve meropenem tek başlarına ve kombinasyondaki MİK değerleri ve FİK indeksi sonuçları.....	48
<b>Tablo 17.</b> Kolistin ve rifampisin tek başlarına ve kombinasyondaki MİK değerleri ve FİK indeksi sonuçları.....	50
<b>Tablo 18.</b> MALDI-TOF MS ile Checkerboard yönteminin karşılaştırılması.....	56



## RESİMLER

<b>Resim 1.</b> <i>Klebsiella spp.</i> 'nin EMB besiyerinde görünümü .....	28
<b>Resim 2.</b> McFarland ölçüm cihazı.....	32
<b>Resim 3.</b> VITEK®2 identifikasyon cihazı.....	32
<b>Resim 4.</b> Her suş için antibiyotik MİC değerinin tespiti.....	37
<b>Resim 5.</b> Checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile kolistin+meropenem kombinasyon/sinerji çalışması .....	43
<b>Resim 6.</b> Checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile kolistin+rifampisin kombinasyon /sinerji çalışması .....	43

## ÖZET

**GİRİŞ VE AMAÇ:** Bu çalışmada karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında matrisli aralı lazer dezorpsiyon/iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi (MALDI-TOF MS) kullanılarak meropenem, kolistin ve rifampisin antibiyotikleri için duyarlılık ve kombinasyon sinerjik etkilerinin Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırılması ve ayrıca MALDI-TOF MS'in bir hızlı sinerji belirleme yöntemi potansiyelinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

**GEREÇ VE YÖNTEM:** : Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda 2014 ile 2020 yılları arasında izole edilen ve genotipik olarak da real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (Gene Xpert Carba-R kiti, Cepheid, ABD) ile belirlenmiş 20 adet kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatı çalışmaya alınmıştır. İn-vitro şartlarda her bir suşun kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin kombinasyonu, kalitatif sonuç veren checkerboard (dama tahtası) mikrodilüsyon ve kantitatif sonuç veren MALDI-TOF MS (bioMerieux, France) yöntemi ile sinerjik etki araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre sinerjik etki gösteren izolatlar, referans yöntem olan Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi sonuçları ile karşılaştırılmıştır.

**BULGULAR:** Checkerboard yöntemi ile kolistin+meropenem kombinasyonunun etkinliğinin araştırıldığı 20 suşun 9'unda ve kolistin+rifampisin kombinasyonu için 20 suşun 17'sinde sinerjik etki saptanmıştır. MALDI-TOF MS yönteminde ise kolistin+meropenem kombinasyonu için 20 suşun 14'ünde ve kolistin+rifampisin kombinasyonu için 20 suşun 12'sinde sinerji tespit edilmiştir.

**SONUÇ:** Dirençli suşlarda antibiyotik kombinasyonlarının sinerjik etkilerinin araştırıldığı MALDI-TOF MS yöntemi ile referans olan Checkerboard mikrodilüsyon metodu karşılaştırıldığında, her iki sistemde kolistin+meropenem kombine ilaç etkileşiminde 9 suşun 6'sında (%66,6) sinerjik uyum gözlenirken, kolistin+rifampisin kombine ilaç etkileşiminde 17 suşun 12'sinde (%70,5) sinerji gözlenmiştir. Sinerji belirleme için MALDI-TOF MS yöntemi hızlı ve güvenilir bir yöntem gibi görünmektedir. Daha ileri ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Kolistin, Karbapenemaz, *Klebsiella pneumoniae*, MALDI-TOF MS, Checkerboard

## SUMMARY

### **Determination Of Synergistic Activities Of Antibiotics In *Klebsiella pneumoniae* Producing Colistin-Resistant Carbapenemase With MALDI-TOF MS**

**INTRODUCTION AND AIM:** In this study, it was aimed to compare the sensitivity and combination synergistic effects for meropenem, colistin, and rifampicin antibiotics in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by using MALDI-TOF MS, and also to determine the potential of MALDI TOF as a fast synergy determination method.

**MATERIALS AND METHODS:** Isolated in Sakarya University Training and Research Hospital Medical Microbiology Laboratory between 2014 and 2020. and 20 colistin resistant *K. pneumoniae* isolates genotypically determined by real-time Polymerase Chain Reaction method (Gene Xpert Carba-R kit, Cepheid, USA) were included in the study. The synergistic effect of each strain was investigated by the combination of colistin + meropenem and colistin + rifampicin, checkerboard microdilution which gives qualitative results and MALDI-TOF MS (bioMerieux, France) method which gives quantitative results under in-vitro conditions. The MALDI-TOF MS device has been studied in the mass range of 10 to 1000 kDa m / z. Then, the presence of peaks between 446.73 m / z and 660.12 m / z was observed. According to the data obtained, the isolates showing synergistic effect were compared with the results of the reference method, Checkerboard microdilution method.

**RESULTS:** Synergistic effects were detected in 9 out of 20 strains in which the effectiveness of colistin + meropenem combination was investigated with the checkerboard method, and in 17 of 20 strains for colistin + rifampicin combination. In MALDI-TOF MS method, synergy was detected in 14 out of 20 strains for colistin + meropenem combination and in 12 out of 20 strains for colistin + rifampicin combination.

**CONCLUSION:** When we compared the results of the MALDI-TOF MS method and the reference Checkerboard microdilution method in resistant strains, 6 of 11 strains (66,6%) showed synergistic harmony in colistin + meropenem combined drug interaction, while 16 strains in colistin + rifampicin combined drug interaction showed 11 Synergistic harmony was observed in (68,7%). The MALDI-TOF MS system appears to be a fast reliable method for synergy determination. Further and comprehensive studies are required.

**Keywords:** Colistin, Carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae*, MALDI-TOF MS, Checkerboard



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bakterilerde giderek artan antibiyotik direnci, antibiyotiklerin keşif sürecinin ilk zamanlarından itibaren bilinmekteydi, bu da dirençli kökenlerden kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli problemlere yol açmaktadır. Önceki dönemlerden farklı olarak, bu enfeksiyonlara daha çok gram negatif patojenler neden olmaktadır (Bradford and Dean 2008).

*Enterobacterales*, *Proteobacteria* ve *Gammaproteobacteria* sınıfında yer alan gram negatif (GN) fakültatif anaerop, çomak şekilli, endospor oluşturmeyen ve 1-5 µm uzunluğundadır. Çoğunlukla sahip oldukları flagellaları ile hareketlidirler. Sadece *Klebsiella spp.* ve *Shigella ssp.* haraketsizdir. Katalaz enzimleri *Enterobacterales* cinsleri arasında değişkenlik gösterir (Williams, Gillespie, Sobral, Nordberg, Smyder, Shallom and Dickerman 2010).

*Enterobacterales*; insanda sıklıkla enfeksiyon etkeni olarak izole edilen, birçok bakteri cinsi ve türüne sahiptir (Bilgehan 2000). *Enterobacterales* üyelerinin genel olarak insanlarda menenjit, cerrahi yara enfeksiyonları, pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olduğu bildirilmiştir. Bu ailenin en önemli cinsleri: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia*, *Morganella*, *Serratia* ve *Providencia* türleridir (Pitout and Loupland 2008).

Bu enfeksiyonlar toplum kökenli enfeksiyonlardan fırsatçı, tedavisi zor enfeksiyonlara kadar geniş bir çapta klinik tablo gösterebilirler. Yakın bir dönemde ise karbapenemleri hidrolize eden karbapenemaz enzimine sahip *Enterobacterales* suşları ortaya çıkmıştır (Falagas, Tansarli, Karageorgopoulos and Vardakas 2014, Nabarro and Veeraraghavan 2015).

Sağlık bakımı ile ilişkili enfeksiyonlarda görülen bu karbapenem dirençli suşların,

daha sonra toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da ortaya çıktığı gözlemlenmiştir (Khatri, Naeger, Wiest , Osborn, Garber, Hecker, Hurless, Rudin, Jacobs, Kalayjian, Salata, van Duin, Perez, Bonomo, Paterson and Harris 2015, Van Duin and Paterson 2016).

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* üyesi bakterilerden çok ilaca dirençli (MDR) ve geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (GSBL) üreten suşların ortaya çıkışı ve dünya çapında yayılması bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Bu da halihazırda kullanılmakta olan antibiyotiklerin etkinliklerine karşı büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Zarrilli, Giannouli, Tomasone, Triassi and Tsakris 2009, Nordmann and Poirel 2002, Bush 2013).

Karbapeneme dirençli bakteriler, MDR gram negatif bakterilerin neden olduğu hayatı olumsuz yönde etkileyen enfeksiyonlara karşı son seçenek olarak kullanılan geniş spektrumlu  $\beta$ -laktam antibiyotikler olan karbapenemlerin kullanımını kısıtlamaktadırlar (El Gamal and Oh 2010, Patel and Bonomo 2013). Gram negatif bakteriler arasında karbapenem hidrolize edici enzimlerin ortaya çıkması hem hastane ortamı hem de toplum için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Patel and Bonomo 2013). Karbapenemazların moleküler ailesi NDM (New Delhi metallo  $\beta$ -laktamaz), VIM (Verona integron mediated metallo  $\beta$ -laktamaz) ve IMP (imipenemaz) gibi metallo  $\beta$ -laktamazlar (MBL'ler) ile serin karbapenemazlardan (KPC "*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase" ve OXA tipi karbapenemazlardan) oluşur (Walsh 2010, Bush 2013).

Karbapenemaz üreten izolatların sebep olduğu enfeksiyonlar her geçen gün artmaktadır. Ülkemizde ise karbapenem direnci olarak KPC, NDM gen bölgelerine sporadik; OXA-48 gen bölgelerine ise endemik olarak rastlanmaktadır (Nordmann and Poirel 2002).

OXA-48 enzimlerinin plazmid aracılığı ile aktarılması bakteriler arasında direncin hızlı bir şekilde yayılmasına sebep olmaktadır (Nazik, Poirel and Nordmann 2005).

Tedaviye ilişkin yeni ajanların ve kombinasyon rejimlerinin araştırılması zorunlu hale gelmiştir. Bakteri direnç mekanizmalarının irdelenmesi, mevcut tedavileri bu direnç mekanizmalarını hedefleyerek kullanma ve antibiyotikleri kombine etme

eğilimini 3n plana çıkarmaktadır. Daha 3nceki çalışmalarda bu konuyla ilgili çok sayıda alternatif tedavi arayışları ve denenen çeşitli tedavi seçenekleriyle ilgili çalışmalar mevcuttur.

Bu çalışmanın amacı, hastanemizde çeşitli klinik 3rneklerden izole edilen karbapenemaz 3reten *K. pneumoniae* izolatlarında MALDI-TOF MS kullanılarak kolistin, meropenem ve rifampisin antibiyotikleri için duyarlılık ve sinerjinin g3rsel olarak saptanması ve t3m izolatların kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin antibiyotik sinerjistik aktivitesini, ayrıca referans y3ntem olarak Checkerboard mikrodil3syon ile MALDI-TOF MS y3ntemini karşılaştırarak sinerjistik uyumları amaçlanmıştır.



## 2. GENEL BİLGİLER

Antibiyotikler; funguslar, bakteriler ve aktinomiçeslerce sentez edilen, mikroorganizmaları öldüren veya çoğalmasını önleyen maddelerdir (Akkan 2003).

Mikroorganizmalar üzerinde yaptıkları etki derecesine, etki mekanizmasına, farmakokinetik özelliklerine ve kimyasal yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılabilirler (Ulusoy 1999, Aktuğlu 1997).

Antibiyotikler, etki spektrumlarına göre ise dar ve geniş spektrumlu antibiyotikler olarak da sınıflandırılırlar (Chambers 2001).

Antibiyotiklerin klinik kullanımına başlanmasıyla birlikte kısa bir zaman içinde bakterilerde direnç oluşumu görülmüştür. Yeni antibiyotiklerle birlikte bakteriler de yeni direnç mekanizmaları geliştirmişlerdir (Özgüneş 2005).

Klinikte sık kullanılan antimikrobik maddelerin direnç mekanizmaları aşağıda ele alınmış ve Tablo 1’de özetlenmiştir (Öztürk 2008).

**Tablo 1.** Antibiyotik direncinin mekanizmaları

Direnç Mekanizması	$\beta$ -L	AG	KL	ML	LA	SUL	TMP	TET	KİN	RIF	VAN	POL
Enzimatik inhibisyon	X	X	Y	Y	-	-	-	-	-	-	-	-
Geçirgenlik azalması	Z	Z	Y	-	-	Z	Z	X	-	Z	-	Z
Hücre dışına aktif pompalama (efflux)	-	-	Z	Z	-	-	X	Z	-	-	-	-
Ribozomda hedef değişim	-	Z	Z	X	X	-	-	X	-	-	-	-
Hücre duvarı öncü maddelerinde değişim	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-
Hedef enzimlerde değişiklik	Z	-	-	-	-	X	X	-	Z	-	Z	-
Hedef enzimin aşırı sentezi	-	-	-	-	-	Z	Z	-	-	-	-	-
İnhibe evreleri atlayan oksotrofik mutantlar	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-

**X:** Her ikisi birlikte(**Y+Z**), **Z:** Kromozom kontrolünde, **Y:** Plazmid kontrolünde, **-:** Henüz belirlenmemiş **AG** (aminoglikozit),  **$\beta$ -L**( $\beta$ -laktam), **LA**(linkozamit), **KİN** (kinolon), **KL**(kloramfenikol), **ML**(makrolit), **POL**(polimiksin), **RIF**(rifampisin), **SUL**(sulfonamid), **TET** (tetrasiklin), **TMP** (trimetoprim), **VAN**(vankomisin)

## 2.1. ENTEROBACTERALES

*Enterobacterales* üyeleri küçük (0,5-3,0 µm), gram negatif çomak görünümünde, peritriş flagellaları ile hareket eden ya da hareketsiz, fakültatif anaerobik, basit beslenme gereksinimleri olan, sporsuz, büyük ve heterojen bir topluluktur (Gür, Hascelik, Aydın, Telli, Gultekin, Ogulnc, Arikan, Uysal, Yaman ve Kibar 2009). *Proteobacteria* ve *Gammaproteobacteria* sınıfı ile ilişkili olan ailelerden sadece *Enterobacterales* ailesinin 51 adet cinsi, yüzlerce türü ve alt türü tanımlanmıştır (Octavia and Lan 2014).

*Enterobacterales* üyeleri tüm dünyada yaygın olarak; toprakta, suda, bitkilerde, insan ve hayvanların doğal barsak mikrobiyotasında bulunurlar. İnsan enfeksiyonlarından en çok izole edilen patojenler arasında yer alırlar. İnsanlar arasında kontamine eller, su ve yiyecekler ile kolayca yayılabilirler. İnsan vücudunda genel olarak her bölgede (kan, alt solunum yolu, santral sinir sistemi, sindirim sistemi ve üriner sistemde) enfeksiyona neden olabilirler (Murray, Rosenthal and Pfaller 2010).

### 2.1.1. Sınıflandırma

Enterik bakterilerin adlandırılması ve sınıflandırılmasında son dönemlere kadar antijenik fenotip ve biyokimyasal fizyolojik özellikleri kullanılmıştır (Wu, Zhang, Han, Sun and Ni 2009). Tablo 2’de enterik bakterilerin sınıflandırılması verilmiştir (Ulusoy 1999).

**Tablo 2.** *Enterobacterales* ailesinin sınıflandırılması

<b>Ailesi</b>	<b>Cinsi</b>	<b>Türü</b>
I. Escherichieae	I. Escherichia II. Shigella	<i>E. coli</i> , <i>E. blatae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i> <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i>
II. Edwardsiellae	Edwardsiella	<i>E. tarda</i> , <i>E. hoshina</i> , <i>E. ictaluri</i>
III. Salmonelleae	Salmonella	<i>S. Typhi</i> , <i>S. Cholerae suis</i> ,, <i>S. Paratyphi</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Gallinarum</i> , <i>S. Pullorum</i>
IV. Citrobacteriaceae	Citrobacter	<i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i>
V. Klebsielleae	I. Klebsiella II. Enterobacter III. Hafnia IV. Serratia	<i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozanae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. omithinolytica</i> <i>K. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. dissolvens</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. nimipressuvali</i> , <i>E. nimipressuvalis</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. hormaechei</i> <i>H. alvei</i> <i>S. marcencens</i> , <i>S. lique</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. ficaria</i>

<b>Tablo 2.</b> <i>Enterobacterales</i> ailesinin sınıflandırılması (devamı)		
VI. Proteeae	I. Proteus II. Morganella III. Providencia	<i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. pennei</i> , <i>P. myxofaciens</i> <i>M. morgani</i> <i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. rustigianii</i>
VII. Yersinieae	I. Yersinia	<i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. aldovae</i>
VIII. Erwinieae	I. Erwinia	<i>E. amylovora</i> , <i>E. carotovora</i>
Herhangi bir aile içine yerleştirilmemiş cinsler	Arsenophonus Budvicia Buttiauxella Cedecea Kluyvera Leclercia Leminorella Moellerella Obesumbacterium Pantoea Pragia Rahnella Tatumella Xenorhabdus Yokonella	

## 2.2. *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli* ilk defa 1885’de Theodor Bald Escherich tarafından diyareli küçük bir çocuğun idrarından izole edilmiştir. Bunu da *Bacterium coli commune* olarak adlandırmıştır. Daha sonra 1919’da Castellani ve Chalmer tarafından *Escherichia* cins adı önerilene kadar *Bacterium coli* olarak kullanılmıştır (Noble 1998, Unat



1986). *E. coli* bu cinsin en çok görülen üyesidir. Bu mikroorganizma idrar yolu enfeksiyonu, gastroenterit, sepsis ve menenjit gibi birçok hastalık etkenidir (Doyle and Schoeni 1984).

### **2.2.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri**

*E. coli* gram negatif, sporsuz bir bakteridir. (Töreci 2002).

*E. coli* buyyon ve agarda fakültatif anaerobik olarak üremektedir. Laktozu fermente etmesi ve indol oluşturması diğer bakterilerden ayırt edilmesi için kullanılmaktadır (Bilgehan 2000, Erdem 1999).

### **2.2.2. Epidemiyolojisi ve Yaptığı Enfeksiyonlar**

*E. coli*'nin oluşturduğu enfeksiyonlar, barsak içi ya da barsak dışı şeklinde ikiye ayrılmıştır (Bilgehan 2000, Erdem 1999). İlki barsaklarda oluşturduğu hastalıklardır ve enfeksiyonlara yol açtığı farklı mekanizmalara göre adlandırılırlar:

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), özellikle küçük yaştaki çocuklarda turist diyaresinin ve bakteriyel diyarenin en önemli sebebidir (Bilgehan 2000, Erdem 1999).

Enteroinvazif *E. coli* (EIEC), mukozada ülserli lezyonlar oluşturmaktadır (Bilgehan 2000). Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), hemorajik kolit yaparlar (Erdem 1999).

Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), emme çağındaki çocuklarda diyarelere neden olurlar, salgın potansiyelleri vardır, patogenezi tam olarak bilinmemektedir (Bilgehan 2000, Erdem 1999).

Enteroaggregatif *E. coli*, kronik diyareye yol açmaktadır (Erdem 1999).

Yol açtığı ikinci grup hastalıklar ise barsak dışındadır. Üriner sistemde oluşan enfeksiyonlardan en sık izole edilen bakteri *E. coli*'dir. Hastane kaynaklı pnömonilerde etken olarak karşımıza çıkabilirler. Hastaların çoğu 50 yaş üstündedir. *E. coli* Tablo 3'te gösterildiği gibi birçok virulans faktörüne sahiptir (Erdem 1999, Tülek 2001).

**Tablo 3.** *E. coli*'nin virülans faktörleri

Bakteriler	Adezinler	Ekzotoksinler
ETEC	Kolonizasyon faktör antijenleri (CFA/I, CFA/II, CFA/III )	Isıya duyarlı toksin (LT-1); Isıya dayanıklı Toksin (STa)
EPEC	Bundle-forming pili (BFP); intimin	
EAEC	Agregatif adherence fimbria (AAF/I, AAF/II, AAF/III)	Enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin (EAST); Plazmid tarafından kodlanan toksin (Pet)
EHEC	Bfp; intimin	Shiga toksin (Stx-1, Stx-2)
EIEC	İnvaziv plasmid antijen (Ipa)	Hemolizin (HlyA)
Üropatojenler	P pili; fimbri	

### 2.2.3. *E. coli* Enfeksiyonlarının Tedavisi

En çok kullanılan antibiyotikler, trimetoprim - sulfametoksazol (TMP - SXT), kinolonlar ve beta - laktamlardır. Alt üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde nitrofurantoin ya da fosfomisin tedavisine karşı olumlu sonuçlar alındığı bildirilmektedir (Panos, Betsi and Falagas 2006).

## 2.3. *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Klebsiella ismi, 1885 yılında Alman bakteriyolog Theodor Albrecht Edwin Klebs (1834-1913) onuruna V. Trevisan tarafından seçilmiştir (Unat 1986, Erdem 1999).

### 2.3.1. Morfoloji ve Kimyasal Özellikleri

*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, hareketsiz, spor oluşturmeyen, genellikle polisakkarit yapısında geniş kapsülü bulunan, gram negatif ve *Enterobacterales* familyasının genel özelliklerini gösteren basil yapılardır (Bilgehan 2000).

*K. pneumoniae*, yoğun bakım ünitesindeki (YBÜ) hastalarda enfeksiyonların yanı sıra, esas olarak idrar, solunum ve kan dolaşımı enfeksiyonlarından sorumlu olan hastane kaynaklı enfeksiyonların önemli bir nedenidir. Antimikrobiyal direncin ortaya çıkması, özellikle karbapenem dirençli izolatların artması, *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların yönetimi için ciddi bir endişe kaynağıdır; çünkü tedavi alternatifleri sınırlıdır. Bu nedenle karbapenem dirençli *K. pneumoniae*, yeni antibiyotiklerin araştırılması ve geliştirilmesinin gerekli olduğu yakın zamanda Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan antibiyotiğe dirençli "öncelikli / kritik" patojenler listesinde yer almaktadır (Barış 2017).

### **2.3.2. Epidemiyolojisi ve Yaptığı Enfeksiyonlar**

*K. pneumoniae* insanda lobar pnömoniye, kronik obstrüktif akciğer hastalığına, yara enfeksiyonlarının oluşmasına sebep olan fırsatçı patojendir (Bilgehan 2000).

*K. pneumoniae* insanların kalın barsağında ve üst solunum yollarının normal mikrobiyotasında bulunmaktadır. *K. pneumoniae* üriner sistem ve nozokomiyal enfeksiyonlara sebep olan bakteriler sıralaması içinde *E. coli* 'den sonra gelmektedir (Aladağ ve Durak 2007).

*Klebsiella pneumoniae*'nin yol açtığı lobar pnömoni özellikle diabetiklerde, alkoliklerde ve kronik obstrüktif akciğer hastalığına sahip kişilerde ortaya çıkmaktadır. Hastalarda ani yükselen ateş, titreme, şiddetli yan ağrıları, dispne, balgam, taşikardi vardır. Lezyonlar hemorajik ve nekrotiktir. Bu sebepten balgam paslı veya "kuş üzümü peltasine" benzer özelliktedir. *Klebsiella pneumoniae* pnömonisi gram negatif bakteri pnömonileri içerisinde daha seyrek görülmektedir, ancak ölüm oranı iki kat daha fazladır. (Bilgehan 2000, Akalın 2003).

Bakteriyemiye damar içi kateter uygulaması, akciğer enfeksiyonu ya da bağırsaktan translokasyon neden olmaktadır. *K. pneumoniae* menenjit, safra kesesi enfeksiyonu ve apse gibi enfeksiyonlar da meydana getirmektedir (Eisenstein and Zaleznik 2000).

### 2.3.3. *K. pneumoniae* İnfeksiyonunda Antibiyotik Tedavisi

Klebsiella'larda aminoglikozidleri modifiye eden enzimler sonucunda tobramisin, gentamisin ile amikasin gibi aminoglikozidlere karşı direnç gelişmektedir. Özellikle beta-laktam grubu antibiyotikler ve kinolonlar, karbapenemlere direnç geliştiren *K. pneumoniae*'lara karşı dirençli hastane infeksiyonlarına neden olabilmektedir (Pais, Khurana and George 2002).

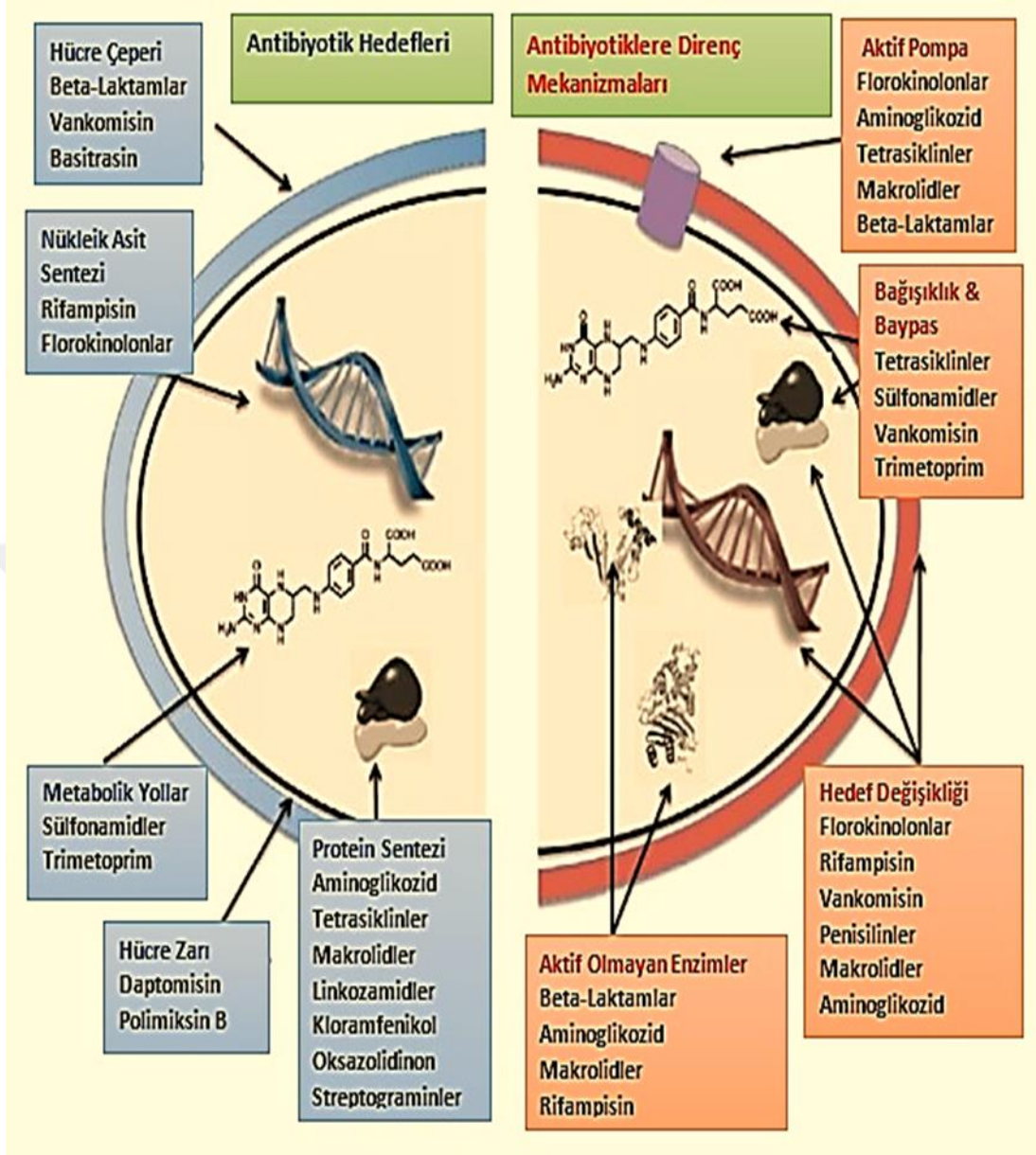
## 2.4. BETA-LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLER

Beta-laktam antibiyotikler çok reçete edilen antibiyotiklerdir. Bu grupta yer alan antibiyotikler kimyasal yapılarında beta-laktam halkası taşırlar. Etki alanları, farmakolojik ve antibakteriyel özellikleri farklı olan, geniş spektrumlu ilaçlardır.

Bu grupta yer alan beta-laktam antibiyotikler; penisilinler, monobaktamlar, sefalosporinler, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörleri olmak üzere 5 gruptan oluşmuşlardır (Gür 2002, Essack 2001).

**Tablo 4.** Beta-laktam grubu antibiyotikler (Essack 2001)

Antibiyotik	Örnek
<b>Penisilinler</b>	Penisilinaza dirençli penisilinler (metisilin, nafsilin, oksasilin, kloksasilin) Aminopenisilinler (ampisilin, amoksisilin) Karboksipenisilinler (karbenisilin, tikarsilin) Üreidopenisilinler (mezlosilin, piperasilin)
<b>Sefalosporinler</b>	<b>1. kuşak</b> (sefazolin, sefalotin, sefaleksim) <b>2. kuşak</b> (sefuroksim, sefaklor, sefamandol, sefamisinler) <b>3. kuşak</b> (sefotaksim, seftriakson, sefpodoksım, seftizoksım, sefooperazon, seftazidim) <b>4. kuşak</b> (sefepim, sefpirom) <b>5. kuşak</b> (seftarolin, seftabiprol)
<b>Karbapenemler</b>	İmipenem, meropenem, ertapenem, doripenem
<b>Monobaktamlar</b>	Aztroneam



Şekil 1. Antibiyotik hedefleri ve direnç mekanizmaları (Gerard 2010).

#### 2.4.1. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antimikrobiyal direncin üç temel mekanizması: (1) antibakteriyel ilaçların enzimatik bozunması, (2) antimikrobiyal hedefler olan bakteriyel proteinlerin değiştirilmesi ve (3) antibiyotiklere membran geçirgenliğindeki değişikliklerdir (Mulvey and Simor 2009).

Penisilinlere ve sefalosporinlere karşı en önemli direnç mekanizması, bakterinin salgıladığı  $\beta$ -laktamazın aracılık ettiği antibiyotik hidrolizidir. Kromozomal  $\beta$ -laktamaz ekspresyonu,  $\beta$ -laktam ilaçlara maruz bırakılarak indüklenebilir veya stabil bir şekilde bastırılabilir.  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direncin üstesinden gelme yöntemleri,  $\beta$ -laktamaz ataklarına karşı stabil olan yeni antibiyotiklerin geliştirilmesini ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerinin  $\beta$ -laktam ilaçlarla birlikte uygulanmasını içermektedir (Bradford 2001).

Ambler sınıflandırması  $\beta$ -laktamazları protein homolojisine göre dört farklı sınıfa ayırmaktadır:

- 1. Sınıf A:** Aktif bölgelerinde serin amino asiti taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.
- 2. Sınıf B:** Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo-beta-laktamazlardır.
- 3. Sınıf C:** Aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşıyan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.
- 4. Sınıf D:** Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır.

Bu sınıflandırmada yer alan  $\beta$ -laktamazlar, A, B, C ve D olmak üzere 4 moleküler sınıfa ayrılmıştır. Sınıf A, C ve D, enzimlerin aktif bölgelerinde serin bulundurur; B sınıfı  $\beta$ -laktamazlar ise hidrolizi kolaylaştırmak için çinko iyonu kullanmaktadır (Ambler 1980). Bush ve Jacoby sınıflandırmasında enzimleri spesifik  $\beta$ -laktam sınıfı antibiyotikleri hidrolize edebilme özellikleri ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerinin (sulbaktam, klavulanik asit ve tazobaktamın) inaktivasyon özelliklerine göre ayırmaktadır (Bush and Jacoby 2010).

OXA, oksasilin hidrolize edici  $\beta$ -laktamazların kısaltılmış halidir ve 1970'lerin sonu ve 1980'lerin başında yaygın olarak kullanılan plazmid tarafından kodlanan  $\beta$ -laktamaz ailesinden biridir (Queenan and Bush 2007). OXA tipi enzimler, klavulanik asit ve sulbaktama dirençli olup hastane enfeksiyonlarından soyutlanan kökenlerde saptanmaktadır (Gür 2002).

**Tablo 5.** Beta laktamazların fonksiyonel ve moleküler sınıflandırılması (Gür 2002)

Bush-Jacoby Sınıflaması (fonksiyonel sınıflama)	Ambler sınıflaması (moleküler sınıflama)	Substrat	Klavulonik Asit Tarafından İnhibisyon	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	Yok	Gram negatif bakterilerin AmpC enzimleri CMY-2-13, LAT-1, MOX-1-2, ACC-1 FOX-1-6, MIR-1, CFE-1, BIL-1
2a	A	Penisilinler	Var	Gram pozitif bakterilerin (Stafilokok) Penisilinazları
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	Var	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş Spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Var	TEM-3- TEM-26, SHV-2-6, PER, CTX-M, VEB, GES, IBC-1e (GSBL)
2br	A	Penisilinler	+/-	İnhibitörlere dirençli TEM-30, TEM-36, TRC-1 (IRT)
2c	A	Penisilinler, karbapenisilin	Var	Karbapenisilini hidrolize eden enzimler, PSE-1-3-4, BRO-1, AER-1, SAR-1
2d	D	Penisilinler, kloksasilin	+/-	Oksasilin ve karbapenem hidrolize eden Enzimler OXA-1, OXA-11, PSE-2 OXA-48, OXA-51
2e	A	Sefalosporinler	Var	<i>P. vulgaris</i> 'in indüklenebilir, sefalosporinazları. CepA, FEC-1, L2
2f	A	Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler	Var	<i>E. cloacae</i> 'nin NMC-A'sı SME, IMI, KPC, GES
3	B	Karbapenemler dâhil Birçok B-laktam	Yok	<i>S. maltophilia</i> 'nın L1'i, <i>B. fragilis</i> 'in CerA'sı Çinko bağımlı karbapenemazlar; IMP, VIM, GIM. 3a, 3b, 3c alt gruplarına ayrılırlar
4	A	Penisilinler	Yok	<i>Burkholderia cepacia</i> penisilinaz

Karbapenemler, günümüzde mevcut antibiyotikler içinde en geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahiptir (Rasmussen and Bush 1997).

Karbapenemazlar iki şekilde bulunabilirler; ilki doğal olarak bulunan kromozomal kaynaklı (intrinsik), ikincisi kazanılmış (ekstrinsik) etkinliğe sahiptir (Poirel, Heritier, Tolun and Nordmann 2004).

Kazanılmış karbapenemazlar karbapenemlerin yanı sıra beta-laktam grubu antibiyotikleri de hidroliz etme etkisine sahiptirler (Rasmussen et al. 1997).

Karbapenemaz enzimlerinden bazılarının fonksiyonel grup ve moleküler sınıflarına göre hidroliz, substrat ve inhibisyon profilleri Tablo 6'da görülmektedir (Rasmussen et al. 1997).

**Tablo 6.** Karbapenemazların substrat ve inhibisyon profilleri (Queenan AM. et al. 2007).

Hidroliz profilleri <sup>a</sup>								Inhibisyon profilleri <sup>b</sup>	
Moleküler Sınıf	Fonksiyonel Grup	Enzim	Penisilinler	Darspek. SS	Geniş Spek. SS	Aztreonam	Karbapenemler	EDTA	Klavulanik Asit
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B	3	IPM	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

<sup>a</sup>semboller: +;kuvvetli hidroliz, ±;zayıf hidroliz, -;hidroliz yok

<sup>b</sup>semboller: +;inhibisyon mevcut, ±;değişken inhibisyon, -;inhibisyon yok



#### **2.4.2.1. Sınıf A (fonksiyonel 2f) karbapenemazlar**

Sınıf A karbapenemazlarda NMC/IMI, SME ve KPC enzimleri bulunur. Sınıf A karbapenemazlar fonksiyonel 2f subgrubunda bulunan beta-laktamazlar, karbapenemler, sefalosporinler, aztreonam ve penisilin olmak üzere tüm beta-laktam antibiyotikleri hidroliz ederler. Klavulanik asit ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleriyle de kısmen inhibisyon göstermektedirler (Nordmann 2002). Klinik olarak büyük önem arz eden KPC enzimi, fenil boronik asitle inhibe olduğu için laboratuvar tanısında kullanılmaktadır (Queenan and Bush 2007).

##### **2.4.2.1.1. Kromozomla kodlanan enzimler: SME, NMC ve IMI**

SME tipleri *S. marcescens* izolatlarında bulunmuştur. NMC-A ve IMI-1 %96 benzer yapıya sahiptir. Bunlar Fransa’da toplanan *Enterobacter cloacae* suşlarından izole edilmiştir. IMI-1 ve SME-1 enzimleri 20. yüzyılda bulunmuştur (Nordmann 2002). “*Serratia marcescens* enzyme” SME; kromozomal grup 2f beta laktamazları eksprese eden suşlar, karbapenem direnci ve geniş spektrumlu sefalosporinlerin duyarlılıklarına göre ayrımları yapılabilir. İlk olarak SME-1 İngiltere’de iki *Serratia marcescens*’te tespit edilmiştir (Wei, Du, Yu, Shen, Chen and Li 2007).

##### **2.4.2.1.2. Plazmidle kodlanan enzimler: KPC ve GES**

KPC ailesinin ilk üyesi KPC-1, 1996’da Kuzey Carolina’da (A.B.D.) *K. pneumoniae*’dan izole edilmiştir (Yiğit et al. 2001). KPC-1’in keşfinden sonra KPC-2, KPC-3 enzimleri sırası ile ABD’nin New York ve Maryland şehirlerinde tanımlandıktan sonra KPC tipi enzimler hızla dünya genelinde görülmeye başlamıştır (Walther-Rasmussen and Hoiby 2007). KPC-2 enzimi İsrail, Çin, Kolombiya, Fransa ve Yunanistan gibi ülkelerden bildirilmiştir (Maltezou, Giakkoupi, Maragos, Bolikas, Raftopoulos and Papahatzaki 2009). “*K. pneumoniae* carbapenemase” KPC ’yi diğer alt grup 2f enzimlerinden ayıran iki tane farklı özellik vardır. Bunlar KPC enzimlerinin plazmidlerle taşınmaları ve substrat hidroliz spektrumlarının sefotaksim gibi aminothiazoloksim sefalosporinleri içermeleridir (Walther-Rasmussen et all 2007). KPC karbapenemazlar plazmidlerle taşındığından, yayılması için büyük bir

potansiyeye sahiptir. Özellikle direnç determinantlarını toplama ve transfer etme yeteneği ile ünlü olan *K. pneumoniae*'de daha çok bulunmaktadır (Bratu 2005, Maltezou 2009). Karbapenem, penisilin, sefalosporin ve monobaktam olmak üzere tüm beta-laktamlara dirence yol açabilirler. Sınıf A olmasına rağmen klavulanik asit ile inhibe olmazlar, boronik asit ile inhibe olurlar (Tsakris 2008, Doi 2008).

GES / IBC ailesi, ilk olarak Fransız Guyanası'nda *K. pneumoniae*'dan, daha sonra Yunanistan'da *E. cloaca*'dan IBC-1 (integron kaynaklı sefalosporin) olarak 2000 yılında tanımlanmış en nadir görülen ailedir (Poirel et al. 2000). Enzimlerin GES ailesini kodlayan genler plazmidler üzerindeki integronlarda lokalizedir. Penisilin ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinler dahil geniş hidroliz spektrumuna sahiptirler (Giakkoupi 2000).

#### **2.4.2.2. Sınıf B (fonksiyonel grup 3) metallo-beta-laktamazlar**

MBL enzimi *Aeromonas hydrophilia* ile *Bacteroides fragilis*'te tanımlanmıştır (Queenan 2007). Diğer beta-laktamazlardan farklı olarak MBL olarak bilinen bu grup, serin beta-laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam) farklı olarak aktif bölgesinde çinko ( $Zn^{++}$ ) iyonları bulundurlar (Walsh 1997). Karbapenemler ve sefalosporinleri hidrolize etmesine rağmen monobaktam grubu (aztreonam) üzerinde etkisi zayıftır (Walsh 1997).

Japonya'da 1991 yılında *P. aeruginosa* ve *S. marcescens* suşlarında IMP-1 enzimi keşfedilmiştir. MBL'lerin imipenemi hidroliz etme hızı bakterinin karbapenemlere olan direncin miktarına bağlıdır (Massidda, Rossolini and Satta 1991).

##### **2.4.2.2.1. Kromozomal olarak kodlanmış metallo-beta-laktamazlar**

Kromozomal olarak kodlanmış MBL enzimlerinin en önemli özelliği indüklenebilir olmalarıdır (Saavedra et al. 2003). Kromozomal kökenli bu enzimler çoğunlukla serin beta-laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar. Bunlar sefalosporinaz ve MBL enzimleridir (Walsh et al. 1997).

#### 2.4.2.2.2. Aktarılabılır metallo beta-laktamazlar

**IMP** Japonya’da 1988 yılında *P. aeruginosa* suşunda bulunmasıyla tanımlanmıştır (Watanabe 1991).

**VIM** “Verona integronencoded metallo beta-lactamase” kazanılan MBL’ların ikinci dominant grubunu oluşturan enzimlerdir (Bahar, Mazzariol, Koncan, Mert, Fontana and Rossolini 2004).

**SPM-1** “Sao Paulo MBL” Brezilya Sao Paulo’da 1997 yılında *P. aeruginosa* klinik suşunun SPM-1 olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı belirtilmiştir (Toleman et al 2002).

**GIM-1** “German imipenemase” Almanya Dusseldorf’da 2002 yılında *P. aeruginosa* izolatında GIM-1 olarak adlandırılan yeni bir gen bulunduğu gösterilmiştir (Castanheira, Mendes, Walsh, Gales and Jones 2004).

**SIM** Kazanılmış MBL’ların son ailesi Kore’de tanımlanmıştır. SIM-1 aminoasit benzerliğiyle IMP ailesine en yakın (% 69) enzimdir (Queenan et all 2007).

**NDM-1** “New Delhi metallo-beta-laktamaz” Yeni bir MBL geni NDM-1’i taşıyan *Enterobacterales* izolatı Hindistan’da 2009 yılında *K. pneumoniae* klinik suşunda tanımlanmıştır (Yong, Toleman, Giske, Cho, Sundman and Lee 2009).

#### 2.4.2.3. Sınıf D serin karbapenemazlar; OXA beta-laktamazlar

**OXA** “Oxacillin-hidroliyzing” beta-laktamazlar en sık plazmidle kodlanan betalaktamaz ailelerinden birini temsil etmektedirler. Bunlar genel olarak klavulanik asit ve Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) ile güçlü şekilde inhibe olmazlar ve amino asit dizilerinin büyük oranda değişken olduğu bilinmektedir. Karbapenemaz aktivitesi olan OXA beta-laktamaz 1993’te Paton ve ark. tarafından tanımlanmıştır. Enzim İskoçya’da bir hastadan 1985’te izole edilen çoklu dirençli *A. baumannii*’den elde edilmiştir. Biyokimyasal olarak EDTA ve klavulanik asitle zayıf inhibe olan beta-laktamazlardır. İmipenem hidrolizi spektrofotometrik olarak ölçülemez fakat

mikrobiyolojik yöntemlerle kolayca belirlenmiştir. Bu enzim ARI-1 (imipeneme dirençli *Acinetobacter*) olarak tayin edilmiş, büyük bir plazmid üzerinde olduğu gösterilmiş ve daha sonra OXA-23 olarak isimlendirilmiştir (Donald, Scaife, Amyes and Young 2000). OXA-58 diğer OXA ailesi üyeleriyle %50'nin altında benzerlik gösterir. Tek başına grup 4'ü oluşturur ve özellikle Fransa, İtalya, Romanya, Yunanistan, Türkiye, Arjantin ve Kuveyt'ten izole edilen *Acinetobacter spp.*' de bulunmuştur. OXA-55 ve OXA SHE'nin her ikisinde *Shewanella algea*'dan izole edilmiştir ve 5. grubu oluşturmaktadır. OXA-48 enzimi, OXA-54 ve *Shewanella spp.*'nin çevresel türlerinde bulunan oksasilinazlarla birlikte 6. grubu oluşturmaktadır (Poirel et al. 2004, Poirel et al. 2005). Dünya çapında OXA oluşturan *Acinetobacter* suşlarında ciddi bir artış görülmesine rağmen OXA-48 ilk defa Türkiye'de bir *K. pneumoniae* izolatında bulunmuştur (Poirel et al 2004).

#### **2.4.2.3.1. OXA-48 beta-laktamazi**

OXA-48 doğadaki rezervuarlarının su kaynaklı bir gram negatif olan *Shewanella oneidensis* olduğu gösterilmiştir (Castanheira, Mendes, Walsh, Gales and Jones 2004). Daha sonra çok sayıda OXA-48 benzeri enzim tanımlanmıştır. Bu suşun test edilen bütün beta-laktamlara, aminoglikozidlere, kloramfenikole, nalidiksik asite, rifampisine ve sülfonamidlere dirençli olduğu saptanmıştır (Poirel et al. 2004). Meropenem hidrolizinin ise diğer OXA (OXA-24, OXA-25, OXA-26 gibi) beta-laktamazlarda olduğu gibi çok düşük bir seviyede olduğu tespit edilmiştir (Afzal-Shah et al. 2001). Ülkemizin, sürveyans çalışmalarında OXA-48 enzimi açısından endemik olduğu raporlanmıştır. Ülkemizle beraber Yunanistan ve İtalya başta olmak üzere Fransa, Hollanda, İspanya gibi Avrupa ülkelerinde de bu enzim tipi sık görülmektedir (Nordmann et al. 2002).

Çeşitli karbapenemaz ve beta-laktamaz enzimlerinin bir arada bulunması da direnç ve tedavi seçenekleri açısından endişe verici olmaktadır. OXA-48 ve NDM-1 enzimlerini birlikte üreten bazı suşlar raporlanmış olup bu direnç varyantlarının oluşması ve yayılması kaygı uyandırmıştır (Seiffert et al 2014). OXA-48 klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile zayıf bir şekilde inhibe olmaktadır. Ancak diğer oksasilinazlarda sık görülen bir özellik olarak OXA-48'in de NaCl ile inhibisyon

gösterdiği gözlemlenmiştir (Heritier, Poirel, Aubert and Nordmann 2003).

## 2.5. ANTİBİYOTİK KOMBİNASYON TEDAVİLERİ

Karbapenemaz üreten suşlar gibi çok ilaca dirençli (MDR) gram negatif bakterilerin yanı sıra mevcut tüm terapötik seçeneklere dirençli patojenler nedeniyle hayatı tehdit eden enfeksiyon oranlarının arttığı bildirilmiştir. Halen geliştirilmekte olan antibiyotiklerin sayısı bu küresel tehdidi kontrol etmek için yetersizdir..

Kombinasyon antibiyotik tedavisi MDR yaygın şekilde ortaya çıkması nedeniyle kritik hastalarda kullanılır. Çoklu ilaç direnci üç veya daha fazla antibiyotik kategorisinde en az bir maddeye duyarlılık eksikliği olarak tanımlanmaktadır. Son zamanlarda GSBL üreten bakterilerin yayılması, geniş spektrumlu antimikrobiyal kullanım ihtiyacını önemli ölçüde artırmıştır (Kanj and Kanafani 2011).

### 2.5.1. Kombinasyon Tedavisi Kullanma Nedenleri

**Genişleyen antibakteriyel spektrum:** Birden fazla ajanın kullanılması, ampirik tedavinin antibakteriyel spektrumunu genişletir. Klinik çalışmalarla, başlangıçta uygun antibiyotik seçiminin, kritik hastalardaki ölümlerin en önemli belirleyicilerinden biri olduğu gösterilmiştir (Kumar, Ellis, Arabi, Roberts, Işık and Parrillo 2009).

**Polimikrobiyal enfeksiyonlar:** Barsak duvarının bütünlüğünün bozulduğu karın içi enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları ve idrar yolu enfeksiyonları genellikle polimikrobiyaldir ve tüm bakteriyel patojenleri kapsamak için birden fazla antibiyotik gerektirir (Schwaber and Carmeli 2007).

**Sinerji:** Antibiyotik kombinasyonları aynı zamanda sinerjik etkileri için de kullanılır. Sinerji iki ajanın birlikte, beta-laktamlar ve aminoglikozid kombinasyonları gibi aktivitelerinin toplamından daha büyük olan birleşik etkisi olarak tanımlanmaktadır (Pournaras, Vrioni, Neou, Dendrinou, Dimitroulia and

Poulou 2011).

**Direncin ortaya çıkışı:** İki ilaca karşı direnç ortaya çıkma olasılığı, tek bir ilaca göre daha düşüktür. Bu antibiyotikler dirençli enfeksiyonlar için büyük umut vaat etmekte, bu ilaçlara karşı direnç gelişmesinin önlenmesi gerekmektedir (Lee, Patel, Huprikar, Calfee and Jenkins 2009).

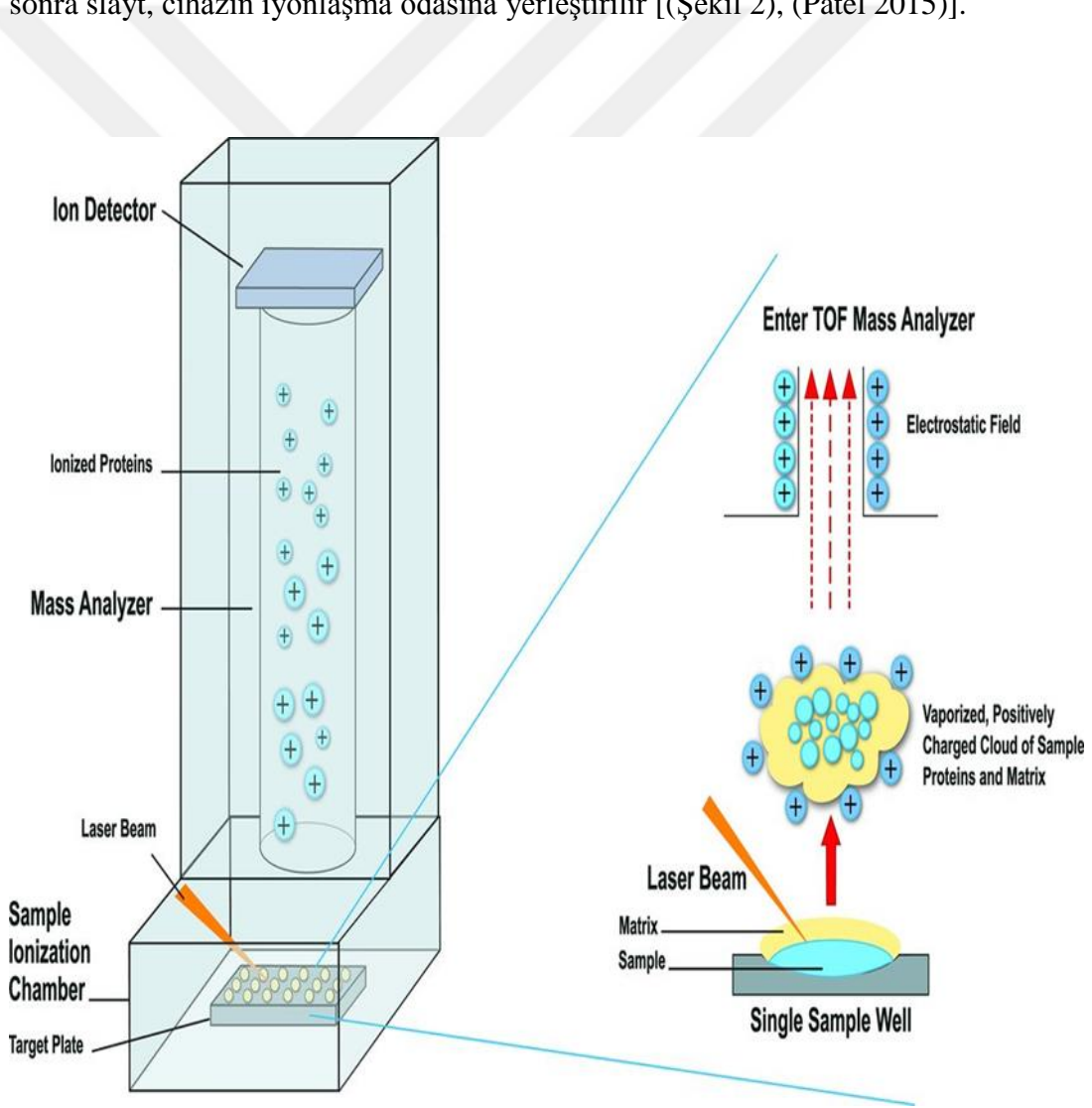
## 2.6. MALDI-TOF MS

MALDI-TOF MS, klinik mikrobiyolojide kültürü yapılan bakteriler ile mantarların hızlı, doğru ve uygun maliyetli bir şekilde tanımlanması için bir araçtır. Bu teknoloji bakteri ve mantarların yanı sıra geniş bir ürün inceleme yelpazesine uygulanabilir. MALDI-TOF MS, klinik mikrobiyoloji laboratuvarı için tartışılmaz yarar sağlayan bir teknolojidir.

Bakterilerin tanımlanması için kütle spektrometrisi 1975'te önerilmiş ancak bozulmamış proteinleri analiz etmek mümkün olmamıştır. İşlem sırasında proteinler parçalanmıştır. Sağlam makromoleküllerin analizi için teknoloji, 1980'lerde parçalanmamış protein analizine izin verecek şekilde icat edilmiştir. 1985 yılında Koichi Tanaka, kimyadaki Nobel Ödülü'nü aldığı biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometrik analizini sağlayan ultra ince metal tozu ve gliserol kullanan bir "yumuşak desorpsiyon iyonizasyonu" yöntemini tanımlamıştır (Frangsmyr and Tanaka 2003).

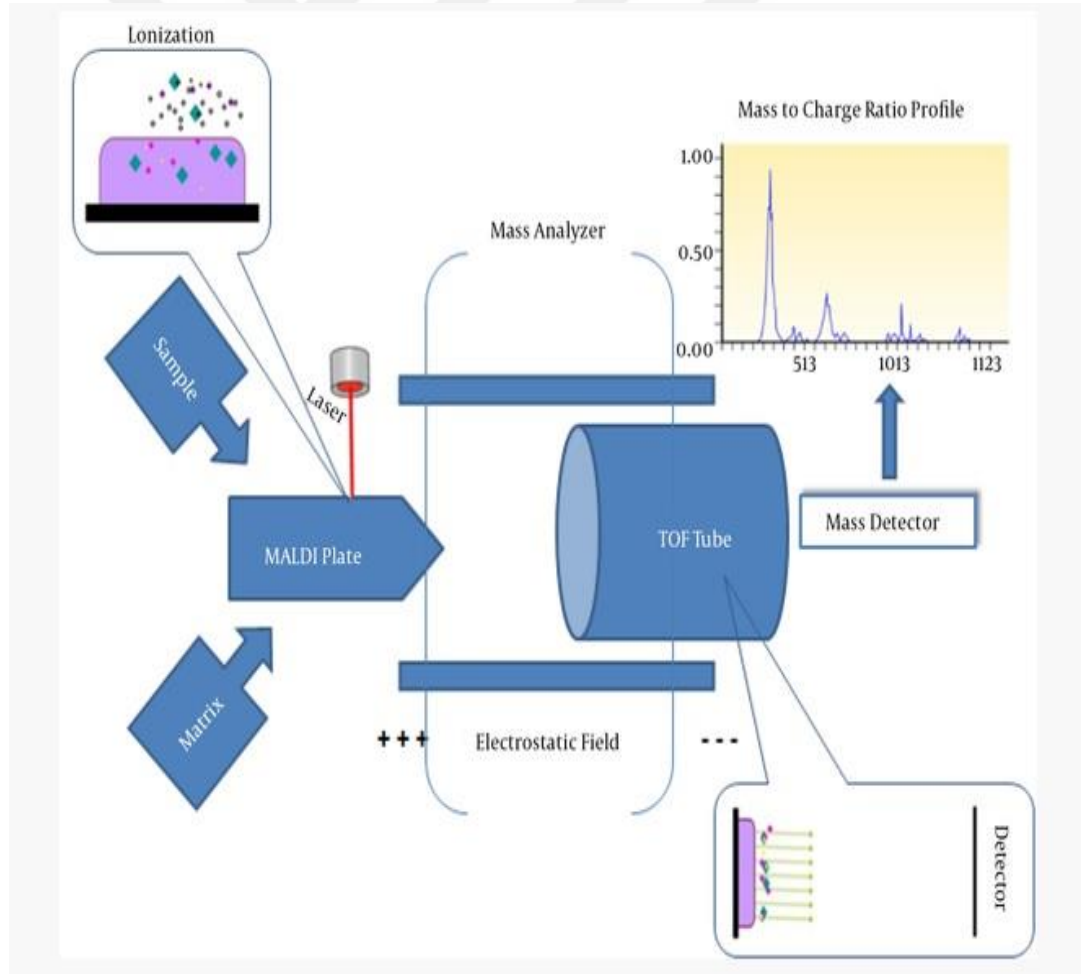
Aynı dönemde Franz Hillenkamp ve Michael Karas organik bir bileşik matriks kullanarak yumuşak desorpsiyon iyonizasyonu rapor etmişlerdir (Karas and Hillenkamp 1998). Bunun için matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) terimi kullanılmıştır. Bilgi teknolojisi / bilgisayar bilimlerindeki ilerlemeler, çeşitli bakteri ve mantar türlerini temsil eden kütle spektrumlarının doğrulanmış kapsamlı veri tabanlarının geliştirilmesi ve sonuçta MALDI-TOF MS'nin otomasyonu ile ilgili veri analizi klinik mikrobiyoloji laboratuvarı için bir araç sağlamıştır (Mellmann, Bulut, Maier, Keckevoet, Ramminger and Iwen 2008).

Klinik mikrobiyolojide MALDI-TOF MS için bir bakteri kolonisinin MALDI slayt kuyucuğu üzerine taşınması (formik asit çözeltisi ilaveli ve ilavesi olmadan) ve hazırlayıcı protein ekstraksiyonu dahil olmak üzere çeşitli hazırlama yöntemleri vardır. Son yöntem tarihsel olarak kullanılmıştır; ancak doğrudan koloni testlerine kıyasla klinik mikrobiyoloji uygulamaları için kullanımı zahmetlidir ve bu nedenle genel olarak tehlikeli veya parçalanması zor organizmaları işlemeye mahsustur. Doğrudan koloni işlemesi kolay, hızlı ve düşük maliyetlidir. Bir koloninin kültür plağından MALDI-TOF MS slayt kuyucuğuna aktarımı ve üzerine formik asit çözeltisinin eklenmesi, maya gibi belirli organizma tipleri için özellikle yararlı olmakta, üretilen kütle spektrumunun kalitesini arttırmaktadır. Kurutulduktan sonra slayt, cihazın iyonlaşma odasına yerleştirilir [(Şekil 2), (Patel 2015)].



Şekil 2. MALDI-TOF kütle spektrometrisi (Patel 2015).

MALDI-TOF MS iki bileşen içerir: İlki MALDI slaytı, ikincisi TOF tüpüdür. MALDI slaytı, numunenin (kan, idrar veya beyin omurilik sıvısı gibi vücut sıvılarının kültürü yapıldıktan sonra elde edilen bakteri ve maya kolonileri) ve matriksin karıştırıldığı metal bir plakadır. Matriks, örnek moleküllerin, lazer ışınlarının doğrudan odaklanması yoluyla yok edilmesini önleyen ve iyonlaşmayı kolaylaştıran bir bileşiktir. Hazırlıktan sonra, karışım kurumaya ve kristalleşmeye bırakılır. Bu numune-matriks kristal karışımı daha sonra lazerle ışınlanır. Kimyasal etkileşimin ardından, numune iyonize olur. İyonlaşma bakteriyel tanımlamada (ribozomal protein gibi biyomoleküllerin analizi için) kritik bir aşamadır, daha sonra proteinler kütle analizörü ile analiz edilir [(Şekil 3), (Calderaro et al 2014, Abdollah et al 2016)].



**Şekil 3.** MALDI slaytı ve TOF borusundan oluşan MALDI-TOF MS (Calderaro et al 2014).



### 2.6.1. MALDI-TOF MS ile Antimikrobiyal Duyarlılık Testi

Yaşamı tehdit eden ciddi enfeksiyonlar, enfeksiyonların nüksetmesi, uzun süreli antibiyotik tedavileri nedeniyle direnç sorunu ile karşılaşmakta ve bu nedenle tıbbi kurulların, komitelerin ve bilimsel toplulukların uluslararası yönergelerine göre mikroorganizmaların belirli antibiyotiklere karşı duyarlılık testleri yapılmaktadır (Gajdacs, Spengler and Urbán 2017).

MALDI-TOF MS'in, bir taraftan tür tanımlaması ile diğer yandan direnç durumu arasındaki boşluğu kapatarak antibiyotik direnci alanında değerli katkısı olduğu görülmektedir. MALDI-TOF MS türe özgü tanımlamaya benzer şekilde, şimdiye kadar dört farklı metodoloji kullanarak yaygın olarak kullanılan rutin antibiyotik duyarlılık testleri (AST) yöntemlerine kıyasla direnç tespitini önemli ölçüde hızlandırmaktadır (Kostrzewa, Sparbier and Maier 2013). Bu metodolojiler şunlardır:

- I.** Karakteristik bir “direnç tepe paterni” tespit etmek için belirli bir mikroorganizmanın MALDI-TOF MS ile kütle spektrumunun analizi. Bu prosedürün prensibi, belirli bir mikroorganizmanın duyarlı ve dirençli izolatlarının MALDI-TOF kütle spektrumlarında klasik suş tiplene metodolojisini kullanarak karakteristik farklılıkları tanımlamaktır (Hrabák et al 2011).
- II.**  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin bakteriyel olarak indüklenen hidrolizinin analizi (MALDI Biyotip-Seçici Antibiyotik Direnci-Beta-Laktamaz Deneyi, MBT-STAR-BL Deneyi). Hidroliz, test edilen beta-laktam antibiyotik ile patojenin 30-180 dakikalık bir inkübasyon süresinden sonra spesifik kütle kaymalarının gözlemlenmesi ile tespit edilmektedir (Sparbier et al 2012).
- III.** Yeni sentezlenmiş bakteri proteinlerine dâhil edilen kararlı (radyoaktif olmayan) izotop etiketli amino asitlerin saptanması (Kararlı İzotop Deneyi ile MALDI Biyotip Direnç Testi, MBT-RESIST Deneyi). Bir suşun duyarlı veya dirençli olup olmadığını belirlemek için antibiyotik varlığında yeni sentezlenmiş proteinlere dâhil edilen izotopik olarak etiketlenmiş aminoasitlerin miktarı kullanılmaktadır (Sparbier et al 2013).
- IV.** Dâhili bir standart (MALDI Biyotip-Antibiyotik Duyarlılık Testi Hızlı Test,

MBT-ASTRA) kullanılarak antibiyotik varlığında ve yokluğunda bakteri üremesinin analizi. Test edilen bakteriler, tür ve antibiyotiğe bağlı yeterli kısa bir inkübasyon süresi boyunca inkübe edilir. Daha sonra, bakteri hücreleri tanımlama iş akışı için kullanılan standart protokole göre lize edilir ve elde edilen kütle spektrumları dâhili bir standartla karşılaştırılır. Bir antibiyotik varlığında üreme azlığı (duyarlılık), bakteriyel biyokütlenin düşük pik yoğunluklarına neden olur; normal üreme (direnç) ise yoğun bakteri protein piklerine yol açmaktadır (Lange, Schubert and Jung 2014).

Antimikrobiyal duyarlılık hızlı organizma tespiti ile, belirli türlerin antimikrobiyal direnç özellikleri veya lokal antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına dayanarak tanımlanan türlerin tipik duyarlılığı tedaviyi yönlendirebilir. Dirençle ilişkili bazı faktörler (örneğin  $\beta$ -laktamazlar) protein yapıda olduğundan ve MALDI-TOF MS proteinleri algıladığından, antimikrobiyal dirence bağlı proteinlerin doğrudan tespit edilebileceği öngörülebilir.  $\beta$ -laktamazlar oldukça aktif olmasına rağmen, düşük konsantrasyonlarda eksprese edilir; ayrıca, molekül ağırlıkları diğer bakteri proteinlerinininkilere benzemektedir. MALDI-TOF MS, suş tiplemesine ilişkin öngörü sağlayabildiğinden ve bazı suşların bazı antimikrobiyal maddelere dirençli olma olasılığı bulunduğundan, suş tipleme antimikrobiyal direnç ile bir ilişki oluşturabilmektedir (Wang et al 2013).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

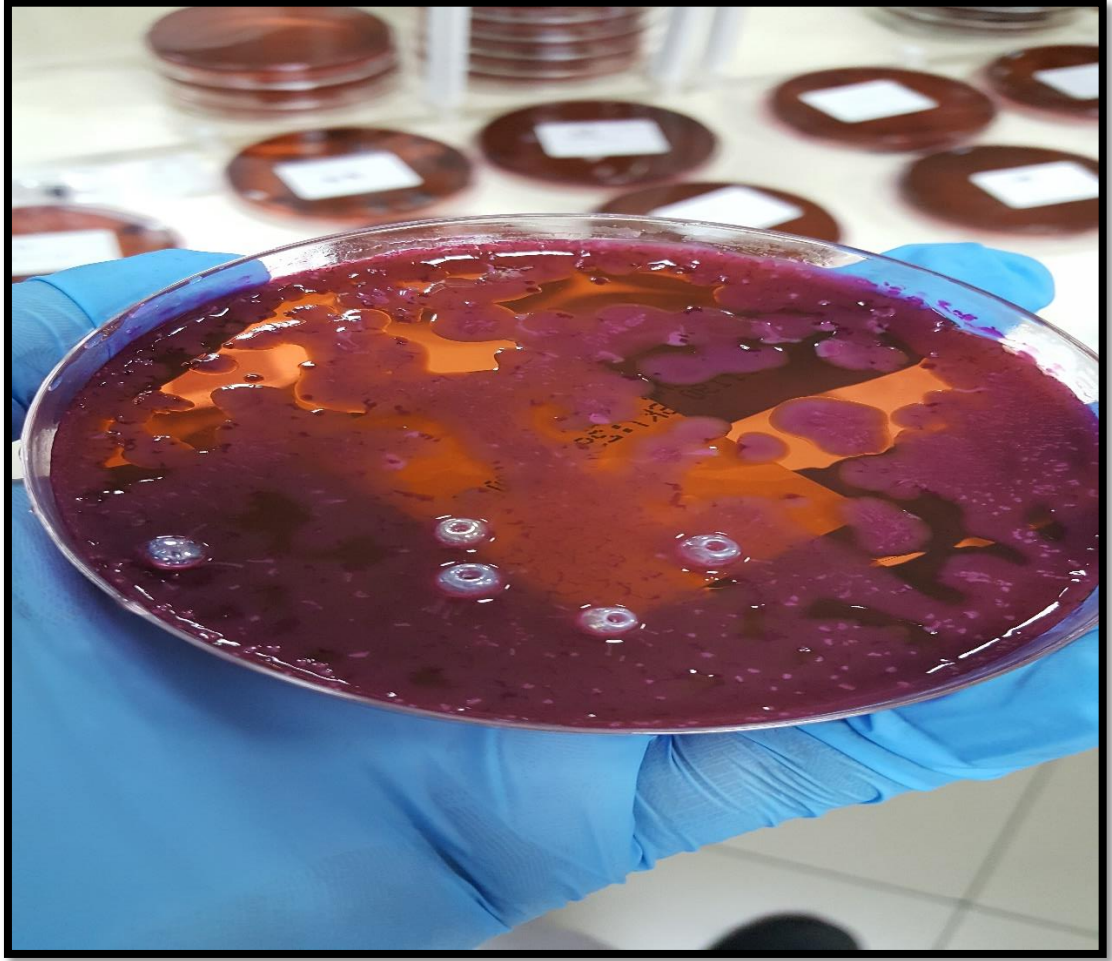
#### 3.1. ÇALIŞMA GRUBU VE ÖRNEKLER

Bu çalışmada T.C. Sakarya Üniversitesi Klinik Araştırmalar Girişimsel Olmayan Etik Kurulu'ndan 16/09/2019 tarihli 271 karar numarası ile onay alınmıştır. (Ek 1). Sakarya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli kliniklerden ve yoğun bakım ünitelerinden gelen klinik örneklerden (kan, idrar, rektal sürüntü, balgam, trakeal aspirat, kateter, periton, vb.) elde edilen 20 bakteri izolatından her hasta için tek suş çalışmaya alınmıştır. Klinik örnekler kültür için kanlı agar besiyerlerine ekilerek 35-37°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. Kan kültürü örnekleri tam otomatik kan kültürü sistemi BacTAlert (bioMerieux, Fransa) cihazında 5 gün süreyle inkübe edilmiştir. *K. pneumoniae* üreme pozitifliği saptanan şişelerden alınan örneklerin tekrar alt kültürleri yapılmıştır. Elde edilen izolatlar çalışılincaya kadar, mikroorganizmaları tutucu özellikte olan porlu yapıya sahip kriyoprezervatif sıvı içerisinde en az 10 adet boncuk bulunan boncuklu saklama besiyerinde -80°C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Bu bakteri örneklerinden VITEK 2® (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile karbapenem dirençli olarak tesbit edilen 20 adet *K. pneumoniae* suşları, boncuklu bakteri saklama tüpleri içerisinde süspanse edilerek -80°C'de muhafaza edilmiştir.

## 3.2. İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTİ

### 3.2.1. İdentifikasyon

Kültür sonuçları önce konvansiyonel olarak koloni morfolojisine göre değerlendirilmiştir. Daha sonra mikroskopik incelemede gram negatif basil morfolojisinde, Resim 1’de görüldüğü gibi EMB besiyerinden pembe-menekşe renkli mukoid koloniler *Klebsiella spp.* şüphesiyle identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık testi yapılması için işleme alınmıştır. Bakteriler 16-18 saat inkübe edildikten sonra, taze kolonilerden 0,5 McFarland dansitometre ölçüm aralığında bakteri süspansiyonu hazırlanmış; Vitek® 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile identifikasyon gerçekleştirilmiştir.



**Resim 1.** *Klebsiella spp.*'nin EMB besiyerindeki görünümü (Sünme testi pozitif mukoid koloniler).

### 3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testi çalışması için identifikasyon amacıyla hazırlanan 0,5 McFarland bulanıklığındaki bakteri süspansiyonundan 145 µl alınarak 3 ml'lik steril deney tüpündeki serum fizyolojik ile süspansiyon edilmiştir. Hazırlanan bakteri süspansiyonları gram negatif antibiyotik duyarlılık test kartlarına önerilen şekilde dağıtılmış ve cihaza yerleştirilmiştir. Her bir kart liyofilize haldeki antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını ve Mueller Hinton Broth içermektedir. Bu kartlar mikrodilüsyon tekniğinin küçültülmüş ve kısaltılmış şekliyle MİK/breakpoint değerini tespit etmektedir.

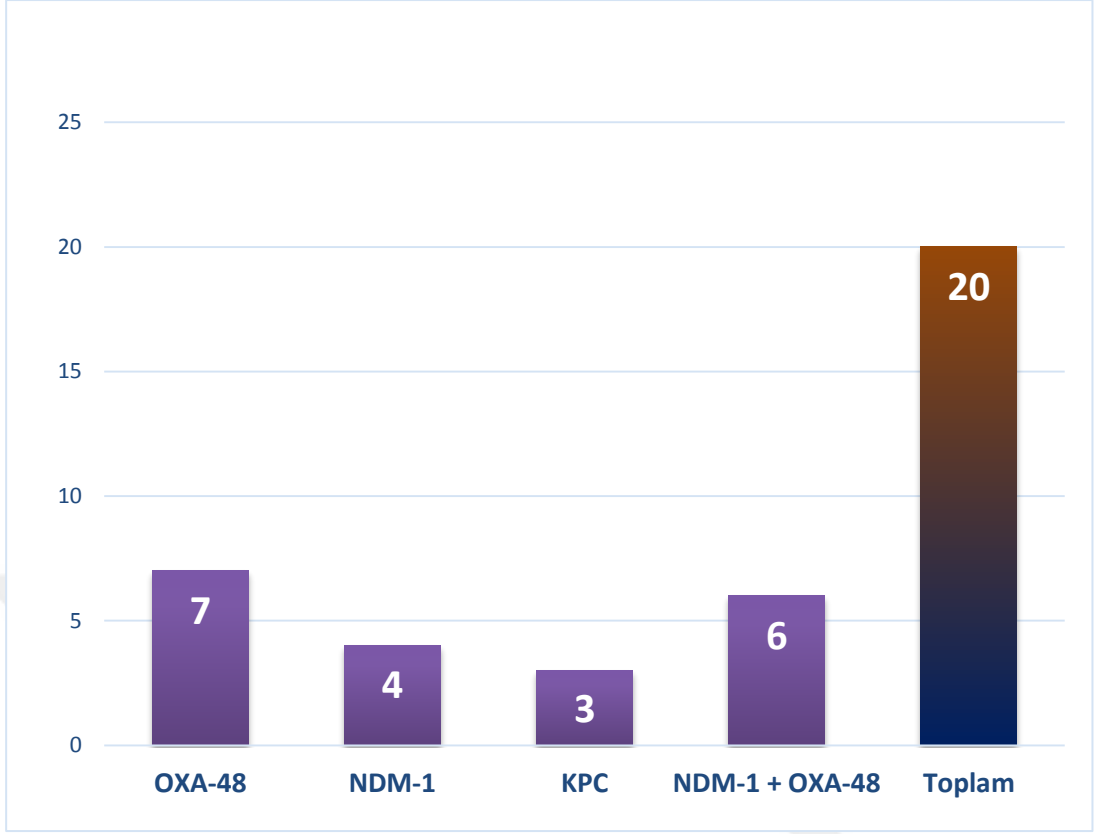
### 3.2.3. Suşların Seçimi

Sakarya Üniversitesi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonuna ait olan, rektal taramalardan ve çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş *Enterobacterales*'e ait karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları kullanılmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Eosin Methylen Blue (EMB) agar plaklarına steril öze yardımıyla tek koloni düşürme tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 35°C'lik etüvde 18-24 saat inkübe edilmiştir.

Suşların identifikasyon ile antibiyotik duyarlılık çalışmaları VITEK® 2 (bioMerieux, Fransa) otomatize sistemi ile yapılmıştır. Karbapenem dirençli olup karbapenemaz üretimi saptanan ve aynı zamanda yaygın ilaç dirençli olan 20 adet suş çalışmaya dahil edilmiştir. Bu suşların genotipik olarak da real-time Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemi (Gene Xpert Carba-R kiti, Cepheid, ABD) ile belirlenmiş. Bu suşlarla ilgili bazı veriler Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Çalışmamızda kullanılan suşların genotipik özellikleri

Suş no:	Cinseyeti	Örnek türü	Hastanın Kliniği	Enzim tipi
1	K	Trakeal Aspirasyon	Yoğun bakım	NDM-1
2	K	Rektal sürüntü	Yoğun bakım	NDM-1 + OXA-48
3	K	Kan Kültürü	Yoğun bakım	NDM-1
4	K	Trakeal Aspirasyon	Yoğun bakım	NDM-1 + OXA-48
5	E	Yara Kültürü	Enfeksiyon Hastalıkları	OXA-48
6	E	Yara Kültürü	Yoğun bakım	OXA-48
7	K	İdrar Kültürü	Cerrahi	OXA-48
8	K	Rektal sürüntü	Yoğun bakım	KPC
9	E	Trakeal Aspirasyon	Yoğun bakım	NDM-1
10	E	Trakeal Aspirasyon	Yoğun bakım	OXA-48
11	E	Rektal sürüntü	Yoğun bakım	NDM-1 + OXA-48
12	K	İdrar Kültürü	Enfeksiyon Hastalıkları	OXA-48
13	E	İdrar Kültürü	Yoğun bakım	OXA-48
14	E	Kan Kültürü	Yoğun bakım	KPC
15	E	Kan Kültürü	Yoğun bakım	NDM-1 + OXA-48
16	K	Kan Kültürü	Yoğun bakım	NDM-1 + OXA-48
17	E	Yara Kültürü	Cerrahi	NDM-1 + OXA-48
18	E	Rektal sürüntü	Yoğun bakım	KPC
19	K	İdrar Kültürü	Dâhiliye	NDM-1
20	E	Yara Kültürü	Cerrahi	OXA-48



Şekil 4. Karbapenemaz türüne göre suşların sayısal dağılımı

### 3.3. SUŞLARIN İDENTİFİKASYON VE ANTİBİYOTİK DUYARLILIKLARININ VITEK® 2 İLE TANIMLANMASI

Doğrulama için *Klebsiella spp.* izolatlarının VITEK® 2 (bioMerieux, Marcy L'Etoile, Fransa) identifikasyon cihazı ile Gram Negatif (GN) kartlar kullanılarak tanımlanması yapılmıştır.

Çikolata agara pasajı yapılan izolatlar steril öze ile alınarak serum fizyolojik ile süspanse edilmiştir. Daha sonra vortexlenerek, McFarland dansitometre ile 0,45-0,55 (ortalama 0,50) ölçüm aralığındaki bulanıklık ayarlanmıştır.



**Resim 2.** McFarland ölçüm cihazı

Mikroorganizmaya uygun olan GN kart konulmuştur. İzolat bilgileri bilgisayara girilmiştir. Bu işlemden sonra kaset cihazın dolum kapısına yüklenerek çalıştırılmıştır.



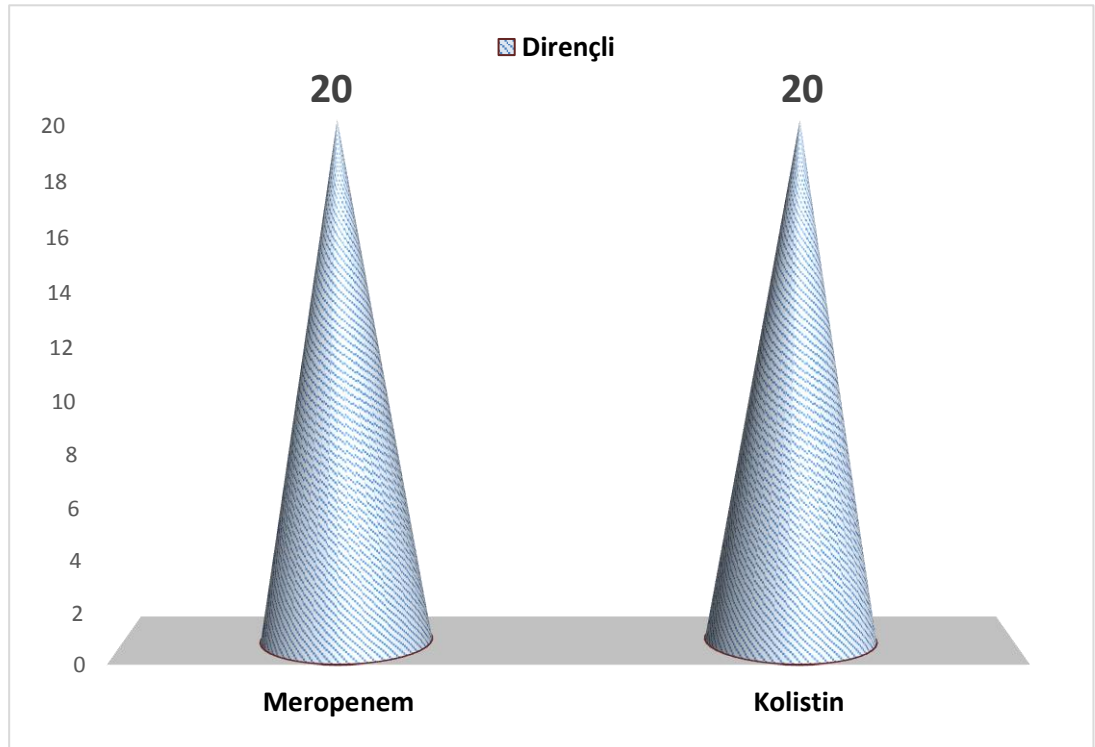
**Resim 3.** VITEK® 2 identifikasyon cihazı



**Tablo 8.** Suşların VITEK® 2 otomatize sisteme göre antibiyotik duyarlılık sonuçları

SUŞ NO	MEM	CS
1	R	R
2	R	R
3	R	R
4	R	R
5	R	R
6	R	R
7	R	R
8	R	R
9	R	R
10	R	R
11	R	R
12	R	R
13	R	R
14	R	R
15	R	R
16	R	R
17	R	R
18	R	R
19	R	R
20	R	R

**MEM:** Meropenem, **CS:** Kolistin, **R:** Dirençli



**Şekil 5.** Suşların VITEK® 2 otomatize sisteme göre antibiyotik duyarlılık grafiği

### 3.4. MOLEKÜLER TANI YÖNTEMİ

#### 3.4.1. Real Time PCR

Moleküler bir yöntem olan real-time, multipleks PCR Xpert® Carba-R kiti sık rastlanan karbapenemaz genlerini (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, and *bla*<sub>IMP</sub>) kısa sürede (~50 dk) başarılı olarak saptayabilmektedir (Lee et al. 2016). Çalışmamızda incelenen suşların enzim tipleri ve sayısal dağılımı Şekil 4'te gösterilmiştir.

### 3.5. ANTİBİYOTİK DUYARLILIK TESTLERİ VE SİNERJİ ÇALIŞMASI

Çalışma kapsamında karbapenem dirençli suşların antibiyotik duyarlılık testleri VITEK® 2 otomatize sistemle (BioMerieux, Fransa) çalışılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılık test sonuçları Tablo 8'te sunulmuştur. Çalışma kapsamında etkinliği denenecek antibiyotiklerin duyarlılık testleri broth mikrodilüsyon (BMD) yöntemi ile, sinerji çalışmaları ise Checkerboard yöntemi ile yapılmıştır. Checkerboard yöntemi ile ilk önce meropenem, kolistin ve rifampisin için ayrı ayrı minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Daha sonra kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin kombinasyonlarının etkinlik ve sinerji çalışması Checkerboard yöntemi ile yapılmıştır. Suşların tümüne Checkerboard yöntemi ile antibiyotiklerin sinerji çalışması yapılmıştır.

#### 3.5.1. Sıvı Mikrodilüsyon Metodu ile Antibiyotik Duyarlılık Testi

Sıvı mikrodilüsyon metodu bir antimikrobiyal ajanın bir mikroorganizmanın üremesini inhibe etmek veya öldürmek için gerekli olan MİK belirlemek için yapılmaktadır. Bakterilerin MİK değerleri, belirli bir türün direnç seviyesini belirlemede yardımcı olabilmekte ve belirli antimikrobiyal ajanların tedavide kullanılmasına ilişkin kararı önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Çalışmada kullanılacak antibiyotiklerden; kolistin ve meropenem (Koçak Farma) toz halde, rifampisin (Defarma) sıvı halde temin edilmiştir. Antibiyotikler için çözücü olarak ve

mikrodilüsyon için EUCAST mikrodilüsyon prosedürüne uygun olarak Mueller Hinton Broth (Becton Dickinson, New Jersey, ABD) besiyeri kullanılmıştır (CLSI M07-A10. 2015).

Mikrodilüsyon metodu 96 kuyucuklu U tabanlı mikropklarda yapılmıştır. Bu yöntem:

- Antibiyotik stok solüsyonunun hazırlanması
- Antibiyotik seyreltme aralığının hazırlanması
- İnokülasyonların hazırlanması
- İnokülasyon
- İnkübasyon
- Okuma ve sonuçların yorumlanması aşamalarından oluşmaktadır.

Denenecek antibiyotik konsantrasyonları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) klinik sınır değerlerini kapsayacak şekilde seçilmiştir (CLSI M100 ED28 2018, EUCAST 2018).

Antibiyotikler için kullanılan sınır değerler Tablo 3'te, test edilen MİK aralıkları Tablo 4'te sunulmuştur. Steril 96 kuyucuklu mikropkların ilk iki sütunundaki kuyucuklara, üreme kontrolü için antibiyotiksiz ve sterilite kontrolü için bakteri içermeyen besiyerleri konulmuştur. Diğer kuyucuklarda antibiyotik solüsyonlarının ½' lik seri dilüsyonları hazırlanmıştır. Daha sonra DensiCHEK Plus (Densichek plus, Biomerieux, Fransa) cihazı ile 0,5 McFarland bulanıklığında hazırlanan bakteri solüsyonu, kuyucuktaki son konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/mL olacak şekilde dilüe edilmiş ve kuyucuklara eklenmiştir. İnkübasyon sonunda (35-37 °C de 16-20 saat) gözle bulanıklığın yani üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak saptanmıştır (CLSI M07-A10 2015).

Standart bir solüsyon için gerekli antibakteriyel toz veya seyreltici miktarları aşağıdaki formüller kullanılarak hesaplanmıştır.

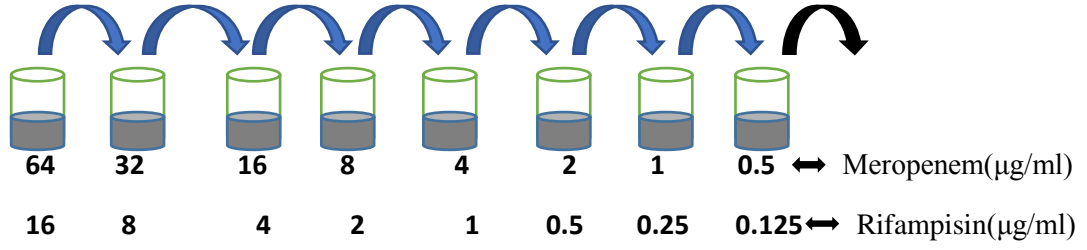
Hacim (ml) x Konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ )

**Ağırlık (mg) =** \_\_\_\_\_

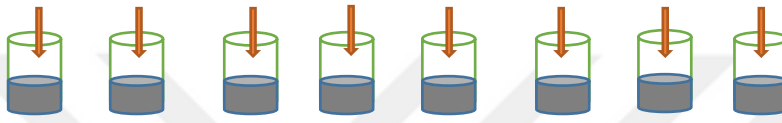
Potens ( $\mu\text{g/mg}$ )

Çalışma için antibiyotiklerin sınır değerlerine göre yapılan hesaplamalar sonucunda; 12.8 mg meropenem 100 ml distile su, 25.6 mg kolistin 100 ml distile su ve 3.2 mg rifampisin distile su ile sulandırılmıştır (meropenem 128  $\mu\text{g/ml}$ , kolistin 256  $\mu\text{g/ml}$ , rifampisin 32  $\mu\text{g/ml}$ ). Stok solüsyonlar hazırlandıktan sonra her bir bakteri için fotometrik yöntemle yoğunluk 0,5 McFarland standardına ayarlanıp, 1:10 oranında MHB ile dilüe edilmiştir. Mikroplaktaki tüm kuyucuklara 0,1 ml MHB konulduktan sonra ilk kuyucuğa hazırlanmış olan antibiyotik solüsyonundan 0,1 ml eklenmiştir ve en az üç kez pipetaj yapılmıştır. Antibiyotik eklenen kuyucuktan 0,1 ml sıvı alınıp diğer kuyucuğa eklenmiş ve seri dilüsyon yapılmıştır. Son kuyucuğa gelindiğinde 0,1 ml sıvı alınıp dışarı atılmıştır. Böylece antibiyotik süspansiyonu 8 kez dilüe edilmiştir. Bütün plaklarda bir adet sterilite kontrol ve bir adet üreme kontrol kuyucuğu bırakılmıştır. Ardından sterilite kontrol kuyucuğu hariç tüm kuyucuklara 0,5  $\mu\text{l}$  bakteri süspansiyonu eklenmiştir. Her bir suş için bu işlem tekrarlanmıştır. 35-37°C'de 16-18 saatlik inkübasyon sonrasında sonuçlar değerlendirilmiştir. Meropenem, kolistin ve rifampisin için her bir suşun tamamen inhibe olduğu en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Her bir mikroplakta 8 suşun MİK çalışması yapılmıştır (Şekil 6).

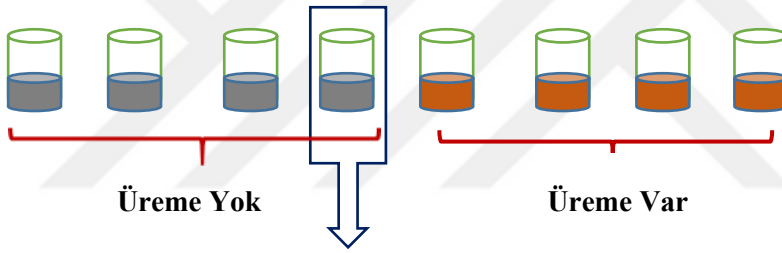
1- Dilüsyon: Önceki konsantrasyonun yarıya indirilmesi



2- İnokülasyon: Her kuyucuğa 0.5 µl bakteri süspansiyonu

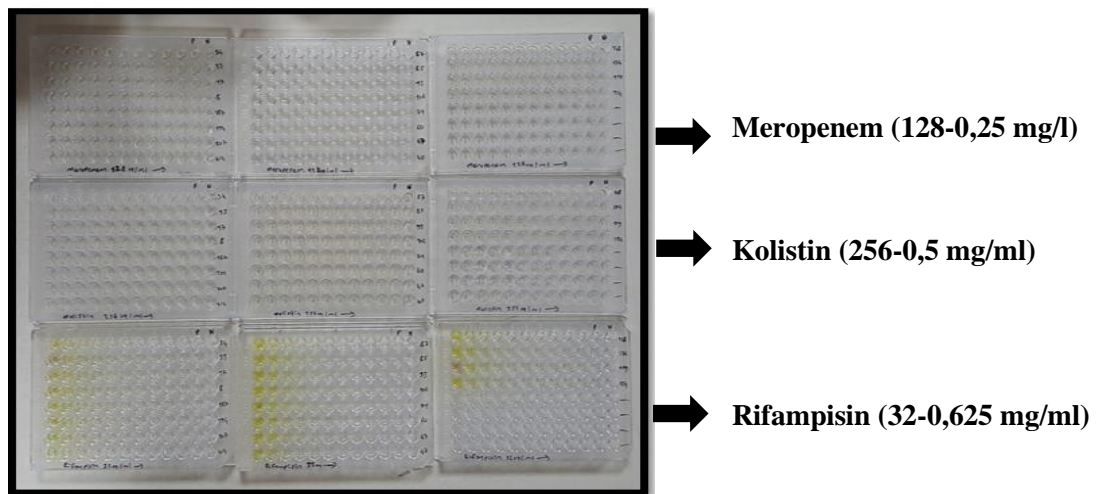


3- İnkübasyon: 35-37°C'de 16-18



4- Okuma: **MİK** değeri

Şekil 6. Sıvı mikrodilüsyon yönteminin şematize edilmiş görüntüsü



Resim 4. Her suş için antibiyotik MİK değerinin tespiti

**Tablo 9.** Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin sınır MİK değerleri (µg/ml)

Kılavuz	Antibiyotik	Dirençli	Orta duyarlı*	Duyarlı
EUCAST	Meropenem	>8	4	≤2
CLSI	Meropenem	≥16	8	≤4
EUCAST	Kolistin	>2	-	≤2
CLSI	Kolistin	≥4**	-	≤2**

**Kılavuzlar:** EUCAST, Clinical breakpoints-bacteria (v 8.1). CLSI, M100 ED28,

\*: Orta duyarlılık kategorisi, EUCAST kılavuzunda 'artmış dozda duyarlı' olarak tanımlanmaktadır.

\*\* : Klinik sınır değer olmayıp wild tip, non-wild tip ayrımı için CLSI tarafından yayınlanan epidemiyolojik değerler.

**Tablo 10.** Suşların broth mikrodilüsyon MİK değerleri

Suş no	Kolistin (256-0,5 µg/ml)	Sonuç	Meropenem (128 -0,25 µg/ml)	Sonuç	Rifampisin* (32-0,625 µg/ml)	Sonuç
1	4	R	16	R	>32	R
2	8	R	16	R	>32	R
3	4	R	16	R	>32	R
4	256	R	64	R	>32	R
5	8	R	16	R	>32	R
6	256	R	128	R	>32	R
7	256	R	128	R	>32	R
8	256	R	128	R	>32	R
9	64	R	16	R	>32	R
10	128	R	128	R	>32	R
11	128	R	128	R	>32	R
12	32	R	16	R	>32	R
13	8	R	64	R	>32	R
14	128	R	16	R	>32	R
15	4	R	16	R	>32	R
16	256	R	128	R	>32	R
17	8	R	64	R	>32	R
18	256	R	16	R	>32	R
19	256	R	128	R	>32	R
20	8	R	128	R	>32	R

R: Dirençli, MİK: Minimum inhibitör konsantrasyon

\*: Rifampisin tek başına sınır değeri olmadığından, duyarlılık yorumu mevcut değil.

### 3.5.2. Checkerboard Yöntemi

Bu çalışmada, karbapenem dirençli *K. pneumoniae*'nin her bir suş ile kombinasyon / sinerji kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin çalışması için birer adet mikropalak kullanılmıştır. Kombinasyonların in vitro etkisini değerlendirmede Checkerboard (dama tahtası) sinerjik yönteminde kullanılmıştır. Laboratuvarımız kültür koleksiyonunda bulunan 20 adet suş için birer adet mikropalak kullanılarak çalışılmıştır. Kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin kombinasyonu çalışması için yukarıda anlatıldığı şekilde dilüsyonları hazırlanmış olan 1 ml'lik antibiyotik tüplerden önce kolistin sulandırımından 50'şer µl mikropalak kuyucuklarına konulmuştur. Mikropalaktaki kolistin konsantrasyonu soldan sağa doğru titreleri giderek azalacak şekilde ayarlanmıştır. Daha sonra kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin olacak şekilde ayrı ayrı meropenem ve rifampisin konsantrasyonu 50 µl ilave edilerek yukarıdan aşağı (A-B-C-D) yöne doğru ilaç seyreltilmiştir. Negatif kontrol (sterilite kontrol) kuyucuğu hariç mikropalaktaki tüm kuyucuklara bakteri süspansiyonundan 10'ar µl konulmuş ve inkübasyona alınmıştır. İnkübasyon sonrası kombinasyon şartlarında kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin MİK değerleri belirlenmiştir. Çalışmadaki sinerjik etki Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirlenen yöntemlerle değerlendirilmiştir (CLSI 2017).

Mikrodilüsyon sonucu MİK değerleri saptanan suşların kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin kombinasyonlarının sinerji çalışması Checkerboard yöntemi ile yapılmıştır (Bal 1999). Bu yöntemde her bir suшта denenecek olan her bir kombinasyon için 96 kuyucuklu U-tabanlı mikropalaklar gerekmektedir. Kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları, kombinasyondaki antibiyotiklerin sütun ve satır yönünde seri dilüsyonları yapılarak azaltılmıştır. Mikropalaklarda kombine edilen antibiyotiklerin artan ve azalan konsantrasyonlarındaki sinerjik, aditif veya antagonist etki gözlemlenmeye çalışılmıştır. Antibiyotik konsantrasyonları, BMD yöntemi ile saptanan MİK değerlerini kapsayacak şekilde planlanmıştır. Tablo 11 ve 12'de örnek olarak kombinasyon çalışmasında mikropalaklar kullanılan dilüsyonlar gösterilmiştir.

**Tablo 11.** Kolistin / meropenem kombinasyonu için Checkerboard çalışmasındaki örnek bir mikropalak planı (kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları ve kontrol kuyucukları).

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	64	
<b>B</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	32	
<b>C</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
<b>D</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
<b>E</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>F</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	MEM	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
<b>G</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>Sterilite Kontrol</b>
	MEM	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>H</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>Üreme Kontrol</b>
	MEM	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	

CS: Kolistin, MEM: Meropenem



**Tablo 12.** Kolistin/rifampisin kombinasyonu için Checkerboard çalışmasındaki örnek bir mikropalak planı (kuyucuklardaki antibiyotik konsantrasyonları ve kontrol kuyucukları)

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	
<b>B</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	
<b>C</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
<b>D</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
<b>E</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
<b>F</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	
	RİF	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
<b>G</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>Sterilite Kontrol</b>
	RİF	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	
<b>H</b>	CS	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	<b>Üreme Kontrol</b>
	RİF	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	

CS: Kolistin, RİF: Rifampisin

Sulandırım sonrası yapılacak olan inokülasyon sonrası her tüp ya da kuyucukta bakteri yoğunluğu  $5 \times 10^5$  CFU / ml olmalıdır. Bunun için; eğer kuyucuktaki hacim 0.1 ml ise 0.5 McFarland süspansiyonu ( $1 \times 10^8$  CFU / ml) 1/10 dilüe edilerek  $10^7$  CFU / ml elde edilmelidir. Bundan 5 µl 0.1 ml içeren kuyucuğa inoküle edildiğinde bakterinin test konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU / ml olur. Kombinasyondaki antibiyotikler ve besiyeri için sterilite kontrol kuyucuğu ayrıldı ve buraya bakteri solusyonu eklenmiştir. İnkübasyondan sonra (35-37 °C de 16-20 saat) öncelikle kontrol kuyucuğu olmak üzere gözle bulanıklığın olduğu ve olmadığı kuyucuklar tespit edilmiştir (Şekil 7 ve 8). Antibiyotik kombinasyonlarının üremeyi inhibe ettiği en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak kaydedilmiştir. Her bir antibiyotiğin bu kombinasyondaki MİK değeri, BMD yöntemi ile belirlenen tek başına MİK değeri ile oranlandığında ise her antibiyotik için fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu (FİK) değeri elde edilmiştir. Kombinasyondaki antibiyotiklerin FİK değerleri de toplanarak sinerji yorumunda kullanılacak olan fraksiyonel inhibitör konsantrasyonu indeksi (FİKİ) hesaplanmıştır. Checkerboard yönteminde formülasyon ve yorumlama aşağıda belirtildiği gibidir:

A antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri

$$FİK_A = \frac{\text{MİK}_{\text{A+B}}}{\text{MİK}_A}$$

A antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

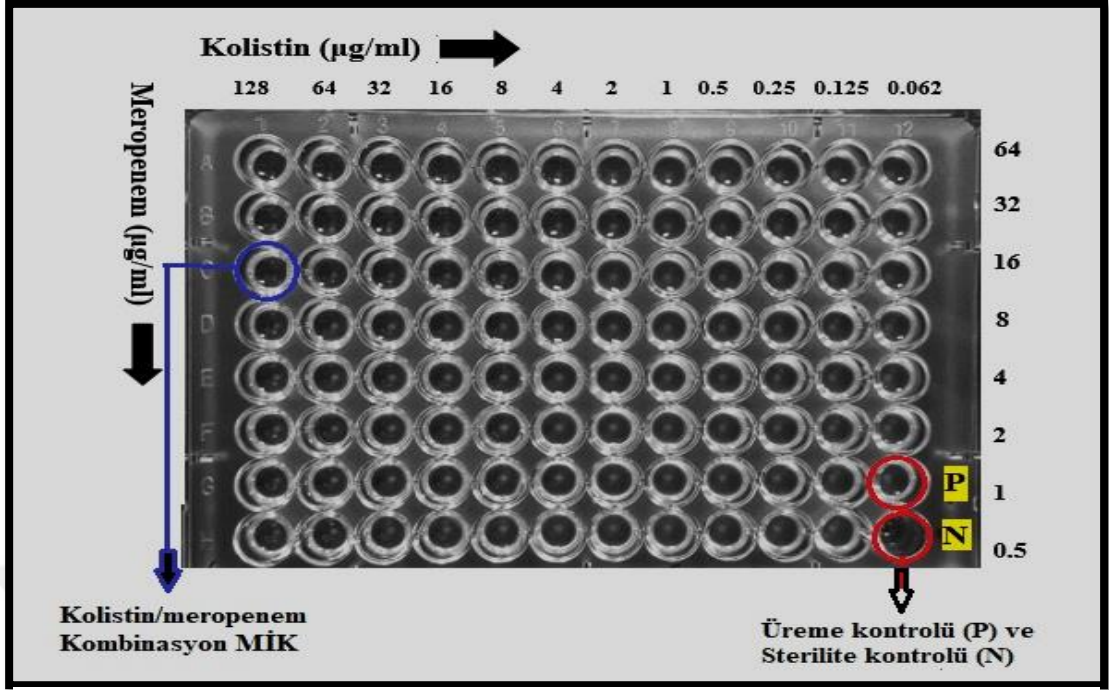
B antibiyotiğinin kombinasyondaki MİK değeri

$$FİK_B = \frac{\text{MİK}_{\text{A+B}}}{\text{MİK}_B}$$

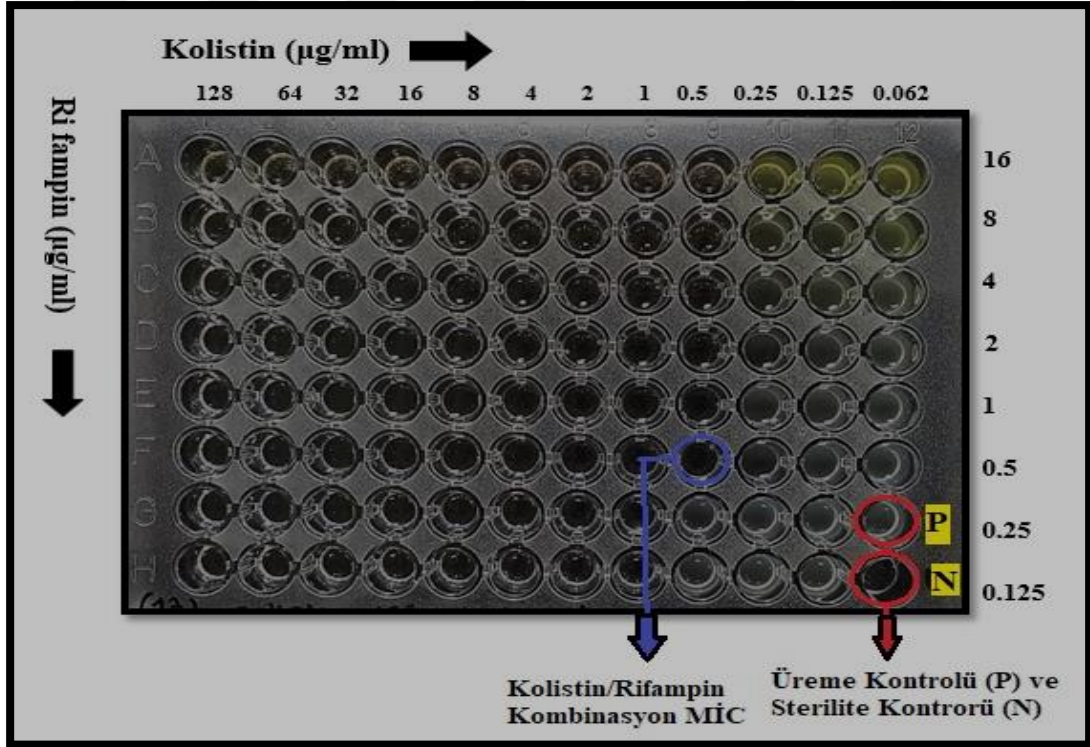
B antibiyotiğinin tek başına MİK değeri

$$FİK \text{ indeksi } (\sum FİK) = FİK_A + FİK_B$$

Toplam FİK indeksi  $\leq 0,5$  ise sinerji,  $0,5 < FİK < 4$  ise additif veya indiferan,  $>4$  ise antagonist etki olarak değerlendirildi (Odds 2003).



**Resim 5.** Checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile kolistin/meropenem kombinasyon/sinerji çalışması



**Resim 6.** Checkerboard (dama tahtası) yöntemi ile kolistin/rifampisin kombinasyon/sinerji çalışması

### 3.5.3. Mikrobiyolojik Tanımlamada MALDI-TOF MS İçin rnek İşleme Yöntemi

Bu işlem için ‘‘*K. pneumoniae*’’ izolatlarına ait stok bakteri kültürlerinin oda sıcaklığında çözünmesi sağlanmıştır. Kanlı agar plaklarına steril ze yardımıyla tek koloni düşürme tekniği ile pasajları yapılmıştır. Besiyerleri 37°C’lik etüvde 24 saat inkübe edilmiştir. İzolatlar steril ze ile alınarak 300 µl Mller-Hinton Broth ile süspansiyon edilmiştir. Daha sonra vortexlenerek, McFarland 3,45 ile 4,55 (ortalama 4,00) bulanıklığı standardına ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyona 20 µl antibiyotik (kolistin 4mg/ml, meropenem 8mg/ml ve rifampisin 2mg/ml) eklenmiştir. Elde edilen bakteri-antibiyotik süspansiyonu 37°C’lik etüvde 2,5 saat inkübe edildikten sonra 2 dakika süreyle 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılarak, pellet kısmı 2 dakika oda sıcaklığında kurutulmuştur. İlk olarak 50 µl %70 formik asit eklenmiştir. Sonra 50 µl asetonitril eklenmiştir. Tekrar 2 dakika boyunca 13.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu kez süpernatant’dan 1 µl alınarak 48 pozisyonlu mikro plak kuyucuğuna damlatılıp, oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra üzerine 1 µl matriks solüsyonu eklenmiştir. Solüsyon tamamen kuruduktan sonra MALDI-TOF MS cihazında çalışmak üzere hazır hale getirilmiştir (Freiwald and Sauer 2009, Rahi et al 2016). Suların analizi MALDI-TOF MS cihazında 10 ile 1000 kDa m/z kütle aralığında alıılmı ve 446.73 m/z ile 660.12 m/z arasındaki piklerin varlığı izlenmiştir.

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışması kapsamında incelenen 20 adet *K. pneumoniae* suşunun;

- izole edildiği hastaların demografik özelliklerine ilişkin bulgular,
- izole edildiği klinik örnek türlerine ve gönderen kliniklere ilişkin bulgular,
- MİK değerlerine ilişkin bulgular,
- PCR sonuçlarına ilişkin bulgular,
- MALDI-TOF MS yöntemine ait bulgular sunulmuştur.

### 4.1. HASTALARIN DEMOGRAFİK ÖZELLİKLERİNE İLİŞKİN BULGULAR

Çalışmamızda *K. pneumoniae* suşlarının izole edildiği hastaların cinsiyet özellikleri dağılımı ele alınmıştır. Çıkan değerler Tablo 13'te görüleceği üzere hastaların %55'inin erkek, %45'inin kadın olduğu görülmüştür.

**Tablo 13.** Suşların izole edildiği hastaların cinsiyet dağılımı

Cinsiyet	Sayı
Erkek	11
Kadın	9
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

## 4.2. SUŞLARIN İZOLE EDİLDİĞİ KLİNİKLERE GÖRE ÖRNEK TÜRLERİ VE BULGULAR

Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının laboratuvara gönderilen klinik örnek türlerine göre ve geldiği kliniklere göre sınıflandırılması Tablo 14 ve Tablo 15'te görülmektedir.

**Tablo 14.** Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının klinik örneklere göre dağılımları

<b>Klinik Örnek Türü</b>	<b>Sayı</b>
Trakeal aspirat	4
Rektal sürüntü	4
Yara	4
İdrar	4
Kan	4
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

**Tablo 15.** Karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının kliniklere göre dağılımları

<b>Klinikler</b>	<b>Sayı</b>
Yoğun Bakım Ünitesi	14
Genel Cerrahi	3
Enfeksiyon Hastalıkları	2
İç Hastalıkları	1
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

### 4.3. CHECKERBOARD YÖNTEMİNDE KOLİSTİN VE MEROPENEM KOMBİNASYONUNUN ANALİZİ

Suşların hepsinin BMD yöntemi ile saptanan kolistin MİK değerleri >128 µg/ml ile 2 µg/ml aralığında değişim göstermiş olup; 20 adet *K. pneumoniae* suşunun CLSI ve EUCAST sınır değerlerine göre tamamının (%100) kolistine dirençli olduğu belirlenmiştir. Aynı şekilde meropenem MİK değerleri >64 µg/ml ile 0,5 µg/ml arasında değişim göstermiş olup; 20 adet *K. pneumoniae* suşunun CLSI ve EUCAST sınır değerlerine göre tamamının (%100) meropeneme dirençli olduğu belirlenmiştir. Çalışmada 2 suş için mevcut konsantrasyonlarda sinerji, aditif ve antagonist etkinlik değerlendirilememiştir (Tablo 16).

**Tablo 16.** Kolistin ve meropenemin tek başlarına ve kombinasyondaki MİK değerleri ve FİK indeksi sonuçları

Suş No	Enzim tipi	CS MİK µg/ml	Komb-CS MİK µg/ml	Komb-MEM MİK µg/ml	MEM MİK µg/ml	FİKİ	YORUM
1	NDM-1 + OXA-48	4	0,5	0,5	1	>0,5 - ≤ 4	aditif
2	NDM-1	8	8	0,5	0,5	>0,5 - ≤ 4	aditif
3	NDM-1 + OXA-48	4	4	0,5	0,5	>0,5 - ≤ 4	aditif
4	NDM-1	>128	32	0,5	64	≤0,5	sinerji
5	NDM-1 + OXA-48	8	8	0,5	0,25	>0,5 - ≤ 4	aditif
6	NDM-1 + OXA-48	>128	128	64	>64	>0,5 - ≤ 4	aditif
7	KPC	>128	128	64	>64	>0,5 - ≤ 4	aditif
8	OXA-48	>128	64	8	>64	≤0,5	sinerji
9	OXA-48	64	32	0,5	16	≤0,5	sinerji
10	NDM-1	128	128	64	>64	>0,5 - ≤ 4	aditif
11	NDM-1 + OXA-48	128	0,25	0,5	>64	≤0,5	sinerji
12	OXA-48	32	0,25	0,5	8	≤0,5	sinerji
13	NDM-1	8	2	0,5	64	≤0,5	sinerji
14	OXA-48	64	0,25	0,5	1	≤0,5	sinerji
15	NDM-1 + OXA-48	2	0	0	1	-	çalışılmadı
16	KPC	>128	>128	>64	>64	-	çalışılmadı
17	OXA-48	8	0,125	0,5	64	≤0,5	sinerji
18	OXA-48	>128	0,125	16	16	>0,5 - ≤ 4	aditif
19	OXA-48	>128	0,125	8	8	>0,5 - ≤ 4	aditif
20	KPC	8	2	0,5	>64	≤0,5	sinerji

CS: Kolistin, MEM: Meropenem, KOMB: Kombinasyondaki, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, FİK: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu



#### **4.4. CHECKERBOARD YÖNTEMİNDE KOLİSTİN VE RİFAMPİSİN KOMBİNASYONUNUN ANALİZİ**

Suşların tümünün BMD yöntemi ile saptanan rifampisin MİK değeri  $>16 \mu\text{g/ml}$  olup, hepsinin rifampisine dirençli olduğu görülmüştür. FİKİ değerlerine göre kolistin+rifampisin kombinasyonu için 20 suşun 17'sinde (%85) sinerji saptanmıştır. Çalışmada 3 suş için mevcut konsantrasyonlarda sinerji, aditif ve antagonist etkinlik değerlendirilememiştir (Tablo 17).



**Tablo 17.** Kolistin ve rifampisin tek başlarına ve kombinasyondaki MİK değerleri ve FİK indeksi sonuçları

Suş No	Enzim tipi	CS MİK µg/ml	Komb-CS MİK µg/ml	Komb-RİF MİK µg/ml	RİF MİK µg/ml	FİKİ	YORUM
1	NDM-1 + OXA-48	4	1	0,125	>16	≤0,5	sinerji
2	NDM-1	8	0,5	0,12,5	>16	≤0,5	sinerji
3	NDM-1 + OXA-48	4	0,125	0,125	>16	≤0,5	sinerji
4	NDM-1	>128	0,25	0,125	>16	≤0,5	sinerji
5	NDM-1 + OXA-48	8	0	0	>16	-	çalışılmadı
6	NDM-1 + OXA-48	>128	0	0	>16	-	çalışılmadı
7	KPC	>128	0	0	>16	-	çalışılmadı
8	OXA-48	>128	0,125	0,125	>16	≤0,5	sinerji
9	OXA-48	64	0,25	0,125	>16	≤0,5	sinerji
10	NDM-1	128	0,25	0,125	>16	≤0,5	sinerji
11	NDM-1 + OXA-48	128	0,5	0,125	>16	≤0,5	sinerji
12	OXA-48	32	8	0,125	>16	≤0,5	sinerji
13	NDM-1	8	1	0,125	>16	≤0,5	sinerji
14	OXA-48	32	1	0,125	>16	≤0,5	sinerji
15	NDM-1 + OXA-48	2	1	0,125	>16	≤0,5	sinerji
16	KPC	>128	32	4	>16	≤0,5	sinerji
17	OXA-48	8	4	0,125	>16	≤0,5	sinerji
18	OXA-48	>128	4	0,25	>16	≤0,5	sinerji
19	OXA-48	>128	16	4	>16	≤0,5	sinerji
20	KPC	8	2	0,125	>16	≤0,5	sinerji

CS: Kolistin, RİF: Rifampisin, KOMB: Kombinasyondaki, MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu, FİK: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyonu

#### 4.5. MALDI-TOF MS ANALİZİ VE VERİLER

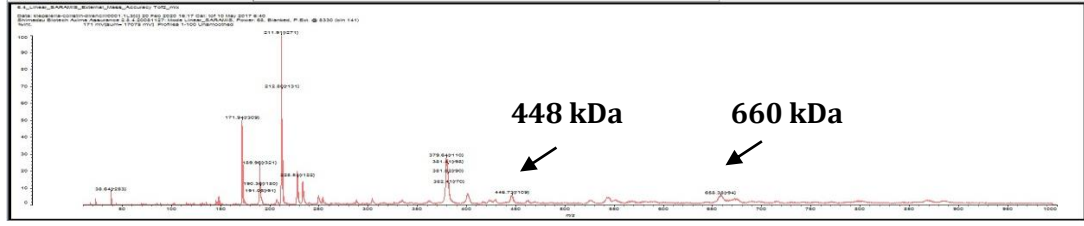
Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+meropenem etkileşiminde sinerjik pozitif tespiti Şekil 7'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B'de ve C'de 448.60 m/z ile 660.12 m/z piklerin varlığı E'de kaybolmuştur.

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+meropenem etkileşiminde sinerjik negatif tespiti Şekil 8'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B'de, C'de ve E'de 446.73 m/z ile 658.38 m/z piklerinde değişim gözlenmemiştir.

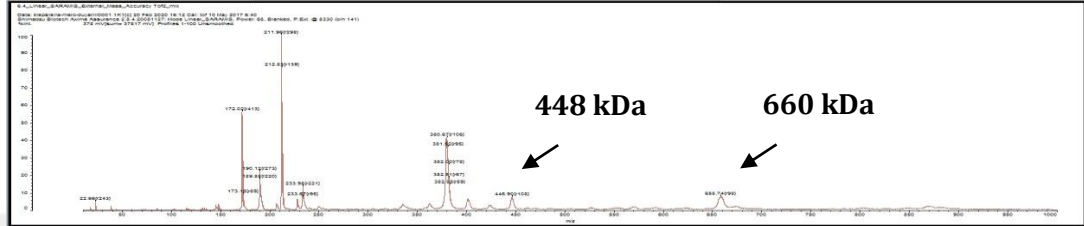
Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+rifampisin etkileşiminde sinerjik pozitif tespiti Şekil 9'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B'de ve C'de 553.08 m/z pikinin varlığı E'de kaybolmuştur.

Karbapenem direncine sahip suşların kombine ilaç kolistin+rifampisin etkileşiminde sinerjik negatif tespiti Şekil 10'deki gibi siyah okla gösterilmiştir. Piklerin; A'da, B'de, C'de ve E'de 558.03 m/z pikinde değişim gözlenmemiştir.

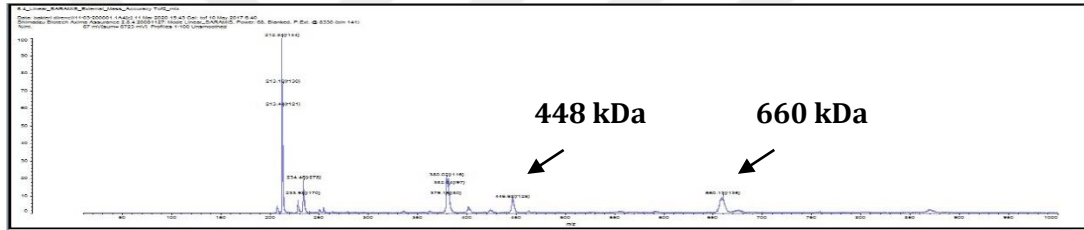
A. *Klebsiella pneumoniae* (Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten Bakteri)



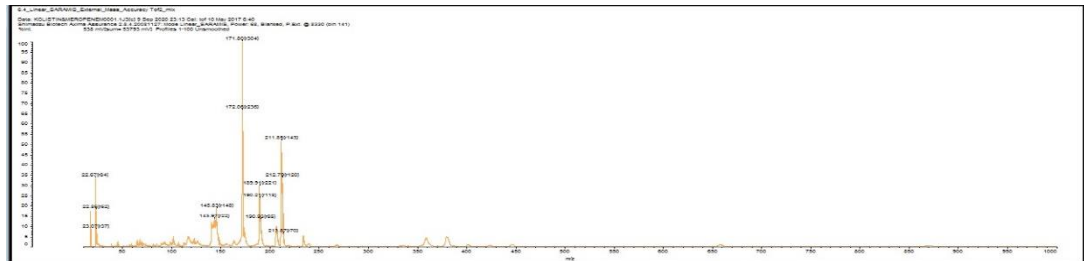
B. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Kolistin)



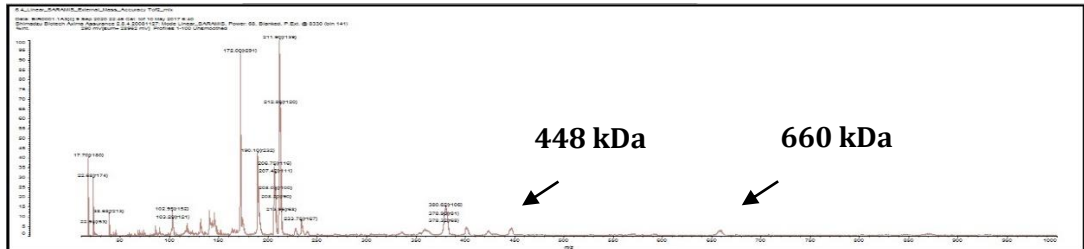
C. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Meropenem)



D. Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Meropenem)

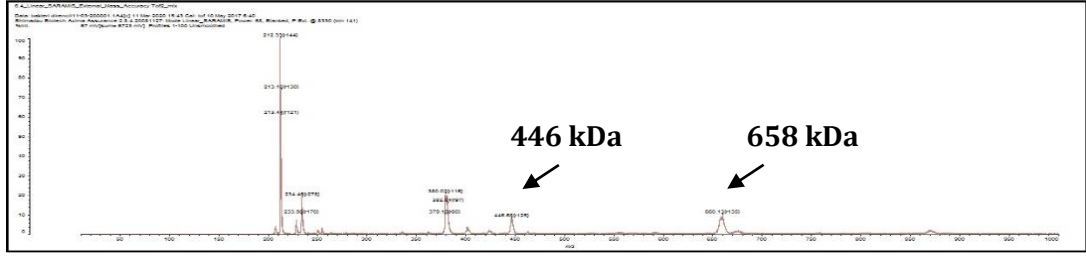


E. *K. pneumoniae* + Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Meropenem)

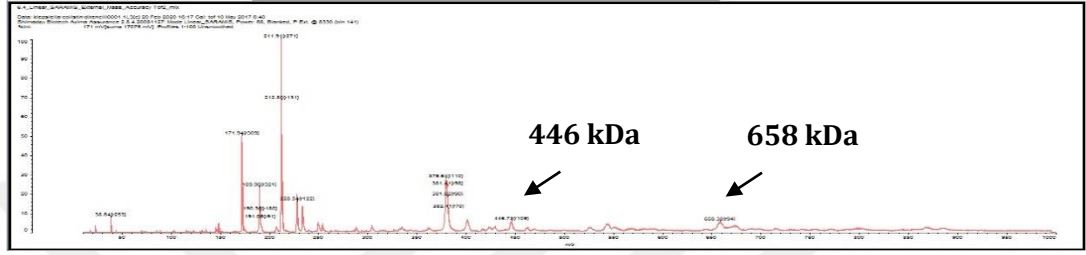


Şekil 7. MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + meropenem) etkileşiminde sinerji pozitif tespiti

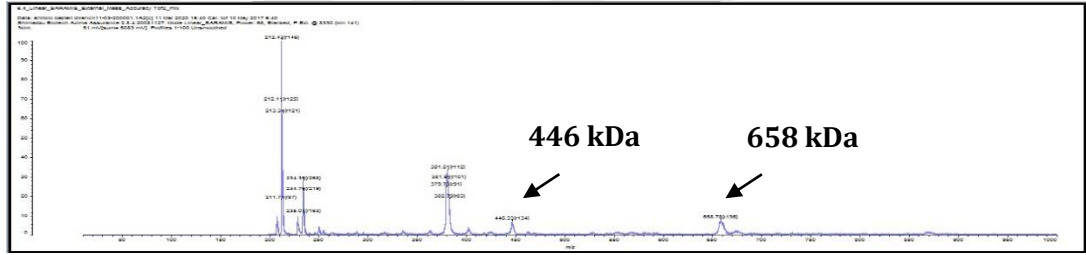
A. *Klebsiella pneumoniae* (Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten Bakteri)



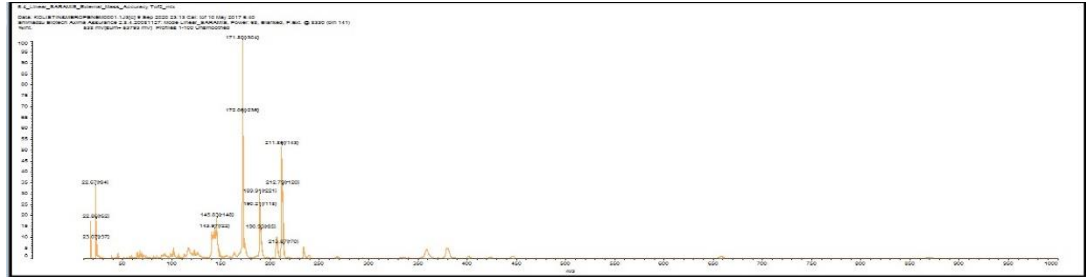
B. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Kolistin)



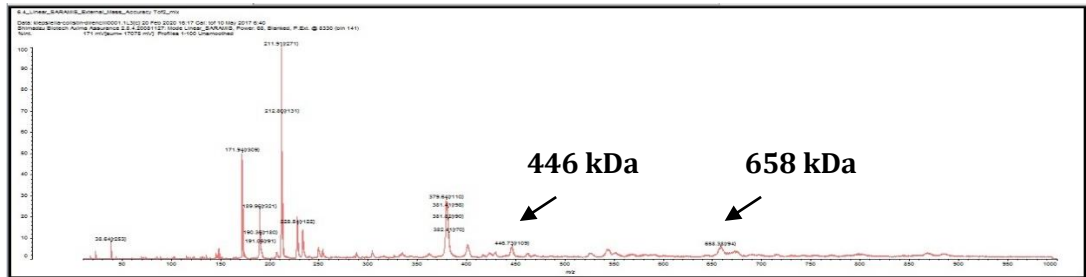
C. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Meropenem)



D. Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Meropenem)



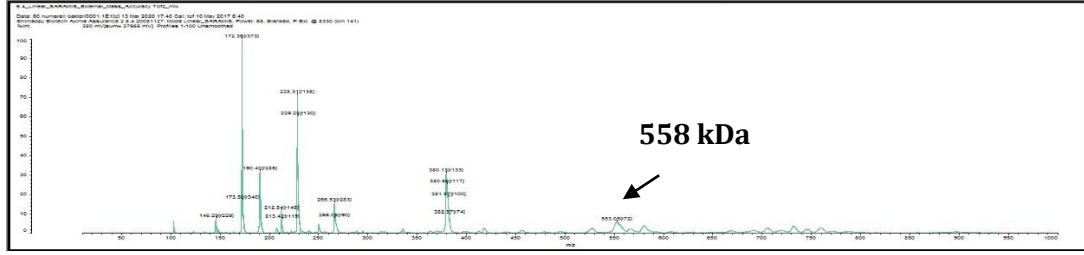
E. *K. pneumoniae* + Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Meropenem)



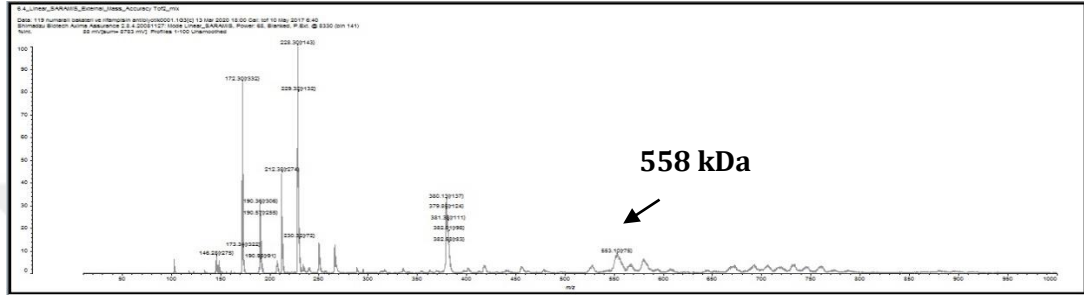
Şekil 8. MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + meropenem) etkileşiminde sinerji negatif tespiti



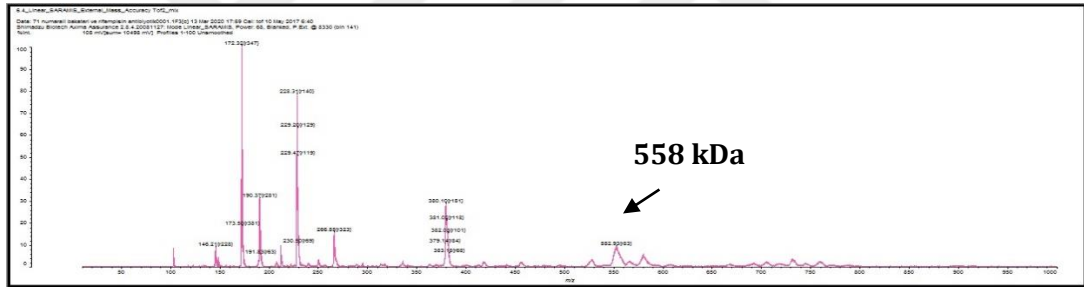
A. *Klebsiella pneumoniae* (Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten Bakteri)



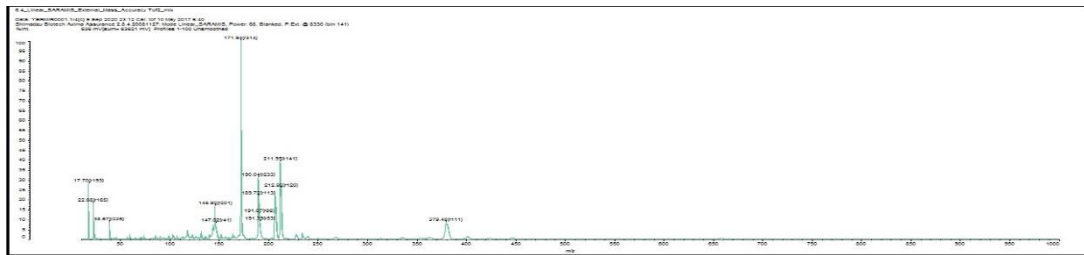
B. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Kolistin)



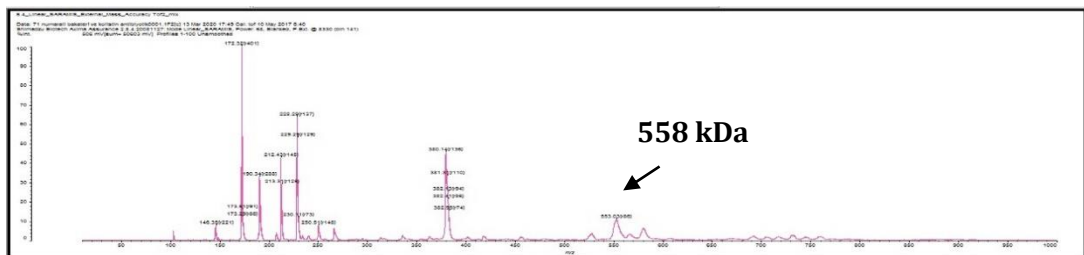
C. *K. pneumoniae* + Antibiyotik (Rifampisin)



D. Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Rifampisin)



E. *K. pneumoniae* + Antibiyotik Kombinasyonu (Kolistin+Rifampisin)



Şekil 10. MALDI-TOF MS yöntemi ile bakteri ve kombine antibiyotik (kolistin + rifampisin) etkileşiminde sinerji negatif tespiti

Kolistin+meropenem kombinasyonunda MALDI-TOF MS yöntemini Checkerboard yöntemi ile kıyasladığımızda 9 suşun 6'sında (%66,6) sinerjik uyum saptanmıştır. Kolistin+rifampisin kombinasyonunda ise 17 suşun 12'sinde (%70,5) sinerjik uyum saptanmıştır (Tablo 18).

**Tablo 18.** MALDI-TOF MS ile Checkerboard yönteminin karşılaştırılması

Hasta No.	Gen - Xpert	Checkerboard (Kolistin + Meropenem)	MALDI-TOF MS (Kolistin + Meropenem)		Checkerboard (Kolistin + Rifampisin)	MALDI-TOF MS (Kolistin + Rifampisin)
1	NDM-1 + OXA-48	Aditif	Sinerji (+)	1	Sinerji	Sinerji (+)
2	NDM-1	Aditif	Sinerji (+)	2	Sinerji	Sinerji (+)
3	NDM-1 + OXA-48	Aditif	Sinerji (-)	3	Sinerji	Sinerji (-)
4	NDM-1	Sinerji	Sinerji (-)	4	Sinerji	Sinerji (-)
5	NDM-1 + OXA-48	Aditif	Sinerji (+)	5	Çalışılmadı	Çalışılmadı
6	NDM-1 + OXA-48	Aditif	Sinerji (+)	6	Çalışılmadı	Çalışılmadı
7	KPC	Aditif	Sinerji (+)	7	Çalışılmadı	Çalışılmadı
8	OXA-48	Sinerji	Sinerji (+)	8	Sinerji	Sinerji (+)
9	OXA-48	Sinerji	Sinerji (+)	9	Sinerji	Sinerji (+)
10	NDM-1	Aditif	Sinerji (+)	10	Sinerji	Sinerji (+)
11	NDM-1 + OXA-48	Sinerji	Sinerji (-)	11	Sinerji	Sinerji (-)
12	OXA-48	Sinerji	Sinerji (+)	12	Sinerji	Sinerji (+)
13	NDM-1	Sinerji	Sinerji (+)	13	Sinerji	Sinerji (+)
14	OXA-48	Sinerji	Sinerji (+)	14	Sinerji	Sinerji (+)
15	NDM-1 + OXA-48	Çalışılmadı	Çalışılmadı	15	Sinerji	Sinerji (-)
16	KPC	Çalışılmadı	Çalışılmadı	16	Sinerji	Sinerji (+)
17	OXA-48	Sinerji	Sinerji (+)	17	Sinerji	Sinerji (+)
18	OXA-48	Aditif	Sinerji (+)	18	Sinerji	Sinerji (+)
19	OXA-48	Aditif	Sinerji (+)	19	Sinerji	Sinerji (+)
20	KPC	Sinerji	Sinerji (-)	20	Sinerji	Sinerji (-)

Sinerji (+): Sinerji var, Sinerji (-): Sinerji yok



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hastanemizde çeşitli klinik örneklerden izole edilen karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında MALDI-TOF MS kullanılarak kolistin, meropenem ve rifampisin antibiyotikleri için duyarlılık ve sinerjinin görsel olarak saptanması ve tüm izolatların kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin antibiyotik sinerjik aktivitesini, ayrıca referans yöntem olarak Checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile karşılaştırarak uyumlarını belirlemek için Türkiye’de bu konuyla ilgili yapılmış ilk çalışma olma özelliği ile literatüre katkıda bulunma amacı ile yapılan bu çalışmada kolistin + meropenem kombine ilaç etkileşimi %66,6 sinerjik uyum gösterirken, kolistin + rifampisin kombine ilaç etkileşiminde %70,5 sinerjik uyum göstermiştir.

Yaşamı olumsuz yönde etkileyen antimikrobiyal direnç dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı problemi olmakta, dirençli suşların oluşturduğu enfeksiyonlar giderek artmaktadır. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) tarafından yayınlanan, antibiyotik direnci açısından tehdit teşkil eden ilk 18 mikroorganizmayı özetleyen raporda tehdit oluşturan mikroorganizmaların üçü tehdit düzeyi açısından “acil öncelikli” grupta sınıflandırılmış olup bunlardan bir tanesi de karbapenem dirençli *Enterobacterales* üyeleri olduğu bildirilmiştir (CDC 2013). Hastane enfeksiyonuna sebep olan mikroorganizmaların bulaş kaynağının belirlenmesinde ve kontrol önlemlerinin alınmasında temel noktayı epidemiyolojik çalışmalar oluşturmuştur (Church 2011). Türlerin tanımı, bir salgının olup olmadığına karar vermede etkilidir. Hastane enfeksiyonu etkeni araştırmalar için önemli veriler sağlamaktadır (Montesinos 2002). Tedavi için gerekli mevcut antibiyotiklerin; endikasyonlarının genişletilmesi, infüzyon ve doz süresi gibi farmakolojik özelliklerin esnetilmesi, antibiyotik kombinasyonlarının ampirik olarak kullanımları gibi alternatif çalışmalar üzerinde durulmaktadır. Diğer yandan in vitro olarak çeşitli

ajanların kombinasyonlarının sinerjik çalışmaları devam etmektedir. Günümüzde de bakteriyel enfeksiyonların tedavi başarısında antibakteriyel sinerji önemli rol oynamaktadır (Pillai 2005). Kombinasyon tedavisinde en başarılı örneklerinden biri  $\beta$ -laktamaz inhibitörü olan klavulanik asit ve  $\beta$ -laktam antibiyotik olan amoksisilin kombinasyonudur (Lee 2016).  $\beta$ -laktam antibiyotik kombinasyonları direnç mekanizmasına karşı son yıllarda uygulanan en etkili tedavi yöntemlerinden biridir. Tedavide düşünülen antibiyotik kombinasyonunun in vivo kullanımından önce mutlaka etken mikroorganizmaya karşı etkisinin bilinmesi gerekmektedir. Yani in vitro şartlarda sinerji etki varlığı ve antagonist etkinin olmadığı araştırılmalıdır. Bu da çoğunlukla kantitatif sonuç veren checkerboard mikrodilüsyon yöntemi ile yapılmaktadır. Checkerboard tekniği, antibiyotik sinerjisini ölçen geleneksel yöntemlerden biridir. Bu yöntem mikropalak çukurlarında iki antibiyotiğin iki yönde seri dilüsyonu ile yapılmaktadır. Deney sonucunda her iki antibiyotik için ayrı ayrı kombinasyondaki MİK değerleri saptanır. Bu değerler antibiyotiklerin tek başına elde edilen MİK değerlerine bölünerek fraksiyonel inhibitör konsantrasyon değerleri elde edilir (Pillai 2005). Bu çalışmada da tedavide alternatif olabilecek bazı antibiyotiklerin ve bazı kombinasyonların söz konusu dirençli bakterilere karşı in vitro etkinliği araştırılmıştır.

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* ailesi üyeleri idrar yolu, solunum yolu, intra abdominal, deri ve yumuşak doku ile pnömoni gibi birçok önemli nozokomiyal enfeksiyonlardan sorumlu mikroorganizmalardır. Bu grupta yer alan *K. pneumoniae* suşlarının toplum ve hastane kaynaklı enfeksiyonlarda en sık görülen mikroorganizmalar olduğu bildirilmektedir. Çoklu ilaç direnci gösteren gram negatif bakterilerin yol açtığı enfeksiyonlarda kullanılan karbapenem grubu antibiyotikler son çare olarak görülmektedir (Bradford et al 2001). Kolistine dirençli olan suşlarda denenen kolistin/apramisin kombinasyonunun sinerjik etkinliği düşük bulunurken çoğunlukla aditif ve antagonist etkiler gözlenmiştir (Kılıç 2018). Kolistinin başka kombinasyonundan olan kolistin/sulbaktam kombinasyonu için sulbaktamın tek başına düşük oranda (%15) etkili olduğu ve bakterisid etkisinin olmadığı, kolistinin ise tüm suşlarda bakterisid olduğu saptanmıştır (Kılbaş 2017).

*K. pneumoniae*, hastanede yatan hastalarda antimikrobilyallere dirençli fırsatçı enfeksiyonların yaygın bir nedeni olarak belirtilmiştir. Karbapeneme dirençli *K.*

*pneumoniae*, nozokomiyal enfeksiyonlara ve yüksek ölüm oranlarına sahip salgınlara neden olabilmektedir. O'Neill raporunda, antimikrobiyal direncin (AMR) yayılmasını durduracak politikalar uygulanmazsa 2050 yılına kadar dirençli enfeksiyonlar nedeniyle yılda 10 milyon yaşamın risk altında olacağı tahmin edilmektedir (Wyres, Lam and Holt 2020, O'Neill 2014). Bu nedenle toplumdaki prevalansı bilmek ve uygun antibiyotik kullanımı ile kontrol altına almak önemlidir.

Çeşitli çalışmalarda, bakteriyel direnç ile etkili antibiyotik tedavisinin başlamasındaki gecikme arasında doğrusal bir ilişki bildirilmiştir (Kollef 2000). Buna bağlı olarak yüksek ölüm oranları, etkili tedaviye başlamadaki gecikmenin sonucudur. Birçok çalışma antibiyotik direncinin yüksek mortalite oranları ile bağımsız bir ilişkisi olduğunu göstermiştir (Juan, Huang, Lin, Yang and Wang 2016). Enfeksiyonların kontrol altına alınarak salgınlara önüne geçilmesi için karbapenem üreten ya da karbapenem dirençli izolatların tanımlanması ile etkin antimikrobiyal tedavinin zamanında başlatılması gerekmektedir (Kılıç 2018). Çalışmamızda, literatürle uyumlu olarak direnç kategorisi kötüleştikçe etkili antibiyotiğe başlanmadaki gecikme ile sepsis, septik şok ve mortalite arasında doğrusal anlamlı bir ilişki bulunmuştur.

Karbapenem dirençli *Enterobacterales* üyelerinin tanımlanması kültürde üretilen izolatların duyarlılık testlerini takiben yapılan doğrulama testleri fenotipik veya genotipik testler ile yapılmaktadır. Testlerin sonuçlanması 2-5 gün sürmektedir.

Çin'de 2015 yılına ait 664 karbapenem dirençli *Enterobacterales* enfeksiyonunun incelendiği çalışmada, etkenlerin çoğunlukla *K. pneumoniae* (%73.3) olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmada genel mortalite oranı %33.5 olarak rapor edilmiştir (Zhang et al 2018). Literatürdeki veriler ve bu çalışmaya benzer şekilde hastanemizde de karbapenem dirençli suşlar içerisinde en çok izole edilen suş *K. pneumoniae* olarak saptanmıştır. Çalışmamızda karbapenem dirençli olan *Enterobacterales* türleri arasında karbapenem üreten ve yaygın ilaç direnci olan *K. pneumoniae* suşları incelenmiştir.

Karbapenemazlardan D sınıfı üyesi olan OXA-48 türü beta-laktamaz, ülkemizde ilk kez İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi hastanesinde yatmakta olan bir hastanın idrar kültüründen izole edilen bir *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir (Carrer et al

2010).

OXA 48 karbapenemaz Avrupa ve Akdeniz ülkelerinde de giderek yaygın hale gelmektedir (Voulgari et al 2013).

Ülkemizde NDM-1 direnç geni ilk kez 2011 yılında 16 yaşında, lösemisi olan, Irak'tan gelen, allogeneik kök hücre nakli yapılan hastada tespit edilmiştir (Poirel et al 2012).

MALDI-TOF MS, rutin teşhis için klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanılmaya başlanmıştır. Bu yöntem, bakteri ve mantarları tanımlamak için kullanılan hızlı bir yöntemdir (Sarı, Çavuş ve Gülay 2016, Idelevich, Grünastel, Wüllenwebwe, Peter and Becker 2014).

Çalışmada (*K.pneumoniae* + kolistin + meropenem) ve (*K.pneumoniae* + kolistin + rifampisin) kombinasyonlu antibiyotik konsantrasyonuna sahip süspansiyon 2,5 saatlik inkübasyon sonrası, MALDI-TOF MS cihazı ile 15 dakika gibi kısa bir süre içinde sonuçları bildirilmiştir.

Elemam, Rahimyan and Doymaz (2010), tarafından yapılan bir araştırmada, rifampisin+kolistin kombinasyonunun karbapenemaz üreten kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarına karşı sinerjik aktivitesini bildirmişlerdir. Rifampisin, gram negatif organizmalara karşı kullanılan bir ilaç olarak kabul edilmez. Bununla birlikte, yukarıda bahsedilen çalışmanın yanı sıra çalışmamızdaki bulgularımız, yüksek dirençli GN organizmaların kolistin+rifampisin ilaç kombinasyonu %85 sinerjik olması, rifampisinin tek başına değilde kolistin ile kombinasyonu faydalı olacağı sonucunu bildirmiştir.

Paul ve ark. na göre (2018), yazdıkları bir makalede, meropenem+kolistin kombinasyonlarının karbapenemaz üreten kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarına karşı sinerjistik aktivitesini bildirmişlerdir. Çalışmamızdaki kolistin+meropenem ilaç kombinasyonu %45 sinerjik olması, kolistin+rifampisin ilaç kombinasyonunun daha etkili olduğu kanaatine varılmıştır.

Son birkaç yıl içinde MALDI-TOF MS ile yapılan çalışmalar klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, maya ve bakteri türlerinin hızlı bir şekilde tanımlanması ve tiplendirilmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır (Fournier et al 2013).

Ling ve ark. na göre (2014), yaptıkları bir çalışmada MALDI-TOF MS ile karbapenamaz üreten bakterilerin saptanması için kullanılmıştır. Bu çalışmada KPC suşlarına doğrudan kolsitin %95 ve meropenem %60 etkili iken rifampisin tek başına doğrudan etki göstermemiştir.

Tängdén and Giske (2015), tarafından yazılan bir makalede kolistin tek başına suşlar üzerinde net bir etkiye sahip olduğu, aynı şekilde başka bir çalışmada çok dirençli bakterilerde birçok kişiye karşı son basamak tedavisi olarak kolistin antibiyotiği kullanıldığı bildirilmiştir.

Çalışmamızdaki kolistin+meropenem ve kolistin+rifampisin ilaç kombinasyon etkinliği karbapenamaz üreten *K. pneumoniae* karşı daha etkili olduğu tespit edilmiştir.

Bu çalışmanın bir sınırlılığı yalnızca *K. pneumoniae* izolatlarının kullanılmasıydı, ancak yöntemimiz diğer *Enterobacterales* türleri içinde gerçekleştirilebilir. Bu nedenle, sonuçlarımızın doğruluğu daha fazla sayıda tür kullanılarak iyileştirilebilir ve bu da çok çeşitli salgınları önlemek için enfeksiyon kontrol önlemlerinin uygulanmasına katkıda bulunacaktır. Bir başka kısıtlılık ise MALDI-TOF MS tabanlı yaklaşımlarda, antimikrobiyal duyarlılık veya direncinin tespitinde ve hızlı teşhisinde geniş verilere sahip açık erişim programlarının bulunmaması çalışmamızın diğer kısıtlılıklarıdır.

Çalışmamız ülkemizde ciddi hastane enfeksiyonu nedeni olan karbapenamaz üreten kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarının çoklu antibiyotik kombiyansonlarına karşı oluşturdukları sinerjik etkileri MALDI-TOF MS cihazı ile irdeleyen ilk çalışmalardandır.

**Sonuçta;** İlaç etkileşimi için MALDI-TOF MS ve çalışmamızda referans olan checkerboard mikrodilüsyon yöntemini karşılaştırdığında, kolistin+meropenem kombine ilaç etkileşimi için 9 suşun 6'sında (%66.6) sinerjik uyumlu iken kolistin+rifampisin kombine ilaç etkileşimi için 17 suşun 12'sinde (%70.5) sinerjik uyum göstermektedir. Sinerji belirleme için MALDI-TOF MS sistemi hızlı güvenilir bir yöntem gibi görünmekte birlikte daha ileri ve kapsamlı çalışmalara gereksinim vardır.

Hiç şüphe yok ki bu tarz çalışmalar, antimikrobiyal duyarlılık veya direncin tespiti ve hızlı teşhisin geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. MALDI-TOF MS teknolojisi şüphesiz önümüzdeki 10 yıl içinde hızlı ve güvenilir şekilde klinik laboratuvarlarda rutin mikrobiyolojik teşhislerin bir parçası haline gelecektir. Bu sonuçlar ışığında; kritik durumdaki hastalarda enfeksiyon varlığında mümkün olan en kısa sürede etken bakterinin tanımlanması, antibiyotik duyarlılığı ve direnç genlerinin tanımlanması, bu hastaların uygun şekilde izole edilmesinin ve akılcı antibiyotik kullanımının mortaliteninin azalmasına katkı sağlayacağı düşüncesindeyiz.



## KAYNAKLAR

Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. (2001). Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, p.583-588.

Akalın H. (2003). Çoğul Dirençli Gram Negatif Bakteriler. Bilimsel Tıp Yayınevi, s.269-287.

Akkan HA, Karaca M. (2003). Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı. YYÜ Vet Fak Derg, 14(2): 72-77.

Aktuğlu Y. (1997). Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Sempozyum Dizisi Yayınları, s.11-53.

Aladağ M, Durak Y. (2007). Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*'lerin Bazı Antibiyotiklere Duyarlılıkları. Fırat Sağlık Hizmetleri Dergisi, 2(4): 40-50.

Ambler RP. (1980). The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 289(1036): 321-331.

Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. (2004). Detection of VIM-5 metallo-beta-lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*, s.282-283.

Barış A, Bulut ME, Öncül A, Bayraktar B. (2017). Yoğun Bakım Ünitelerinde

Yatan Hastalara Ait Klinik İzolatların Tür Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıkları. J Turk Soc Intens Care, 15(1): 21-27.

Bilgehan H. (2000). *Escherichia*. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları (Uygulama Konuları ile), 10. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, s.3-17.

Bilgehan H. (2009). *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, 5. Baskı, Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi, İzmir, s.1-102.

Bradford PA, Dean CR. (2008). Resistance of Gram-negative bacilli to antimicrobials. In: Fong IW & Drlica K. (eds) Antimicrobial resistance and implications for the 21st century. New York, Springer, p.97-159.

Bradford P. (2001). Extended-Spectrum b-Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clin Microbiol Rev, 14(4): 933-951.

Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M. (2005). Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. Arch Intern Med, s.1430-1435.

Bush K, Jacoby GA. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 54(3): 969-976.

Bush K. (2013). Carbapenemases: Partners in crime. J Glob Antimicrob Resist, 1(1):7-16.

Calderaro A, Arcangeletti MC, Rodighiero I, Buttrini M, Gorrini C, Motta F. (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. Sci Rep, s.4-6803.



- Carrer A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. (2010). Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*, s.1369-73.
- Castanheira M, Mendes RE, Walsh TR, Gales AC, Jones RN. (2004). Emergence of the extended-spectrum beta-lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 2344-2345.
- Chambers FH, Goodman LS, Gilman A. (2001). Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition. The McGraw-Hill Company, USA. Antimicrobial Agents, s.1143-1169.
- Church DL, Chow BL, Lloyd T, Gregson DB. (2011). Comparison of automated repetitive-sequence-based polymerase chain reaction and spa typing versus pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, s.30-37.
- Dever LA, Dermody TS. (1991). Mechanisms of bacterial resistance to antibiotics. *Arch Intern Med*, 151(5): 886-95.
- Doi Y, Potoski BA, Adams JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. (2008). Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol*, s.4083-4086.
- Donald HM, Scaife W, Amyes SG, Young HK. (2000). Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. *Antimicrob Agents Chemother*, s.196-199.
- Doyle MP, Schoeni JL. (1984). Survival and growth characteristics of *Escherichia*

*coli* associated with hemorrhagic colitis. Appl Environ Microbiol, 48(4): 855-856.

Eisenstein IB, Zaleznik FD. (2000). Principles and Practice of Infectious Diseases, Churchill Livingstone, s.2294-2310.

Elemam A, Rahimyan J, Doymaz M. (2010). In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. J Clin Microbiol, 48: 3558-62.

El Gamal ML, Oh CH. (2010). Current status of carbapenem antibiotics. Current Topics in Medical Chemistry, 10(18): 1882-97.

Erdem B. (1999). Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, s.471-515.

Essack SY. (2001). The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. Pharm Res, s.1391-1399.

Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. (2014). Deaths attributable to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. Emerg Infect Dis, 20(7): 1170-5.

Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. (2013). Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nature Reviews Microbiology, 11: 574-585.

Frangsmyr T, Tanaka K. (2003). The origin of macromolecule ionization by laser irradiation. Nobel Prize Organisation, Sweden.

Freiwald A, Sauer S. (2009). Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. Nature Protocols, 4: 732-742.

- Gajdács M, Spengler G, Urbán E. (2017). Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria: Rubik's Cube of Clinical Microbiology, Antibiotics, s.6:25.
- Gerard D. (2010). Antibiotic targets and mechanisms of resistance. BMC Biology, s.8:123.
- Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. (2000). IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. Antimicrob Agents Chemother, s.2247-2253.
- Gür D, Hascelik G, Aydın N, Telli, M, Gultekin M., Ogulnc D, Arıkan OA, Uysal S, Yaman A, Kibar F. (2009). "Antimicrobial resistance in gram-negative hospital isolates: results of the Turkish HITIT-2 Surveillance Study of 2007", J Chemother, 21(4): 383-389.
- Gür D. (2002). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. Nobel tıp kitap evleri, s.182-93.
- Gür D. (2002).  $\beta$ -laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi, 33: 102-109.
- Heritier C, Poirel L, Aubert D, Nordmann P. (2003). Genetic and functional analysis of the chromosome-encoded carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-40 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother, s.268-273.
- Hrabák J, Walkova R, Studentova V. (2011). Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol, s.3222-7.

- Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenwebwe J, Peters G, Becker K. (2014). Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*, 20: 1001-6.
- Juan CH, Huang YW, Lin YT, Yang TC, Wang FD. (2016). Risk factors, outcomes, and mechanisms of tigecycline-nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(12): 7357–63.
- Kanj SS, Kanafani ZA. (2011). Current Concepts in Antimicrobial Therapy Against Resistant Gram-Negative Organisms: Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae, Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae, and Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clinic*, s.250-259.
- Karas M, Hillenkamp F. (1988). 10000 Dalton'u aşan moleküler kütleli proteinlerin lazer desorpsiyon iyonizasyonu. *Anal Chem*, s.2299 – 301.
- Kılbaş İ. (2017). Karbapeneme Dirençli *Acinetobakter sp.* Suşlarında Kolistin/Sulbaktam Kombinasyonunun Sinerjik Etkinliğinin İn Vitro Olarak Araştırılması. SAÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Sakarya, (Doç. Dr. Mehmet KÖROĞLU).
- Kılıç Ü. (2018). Karbapenemaz Üreten Enterobacterales Kökenlerinde Çeşitli Antibiyotik Kombinasyonlarının İn Vitro Etkinliklerinin Araştırılması. SAÜ, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi, Sakarya, (Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ).
- Khatri A, Naeger Murphy N, Wiest P, Osborn M, Garber K, Hecker M, Hurless K, Rudin SD, Jacobs MR, Kalayjian RC, Salata RA, van Duin D, Perez F, Bonomo RA, Paterson DL, Harris PN. (2015). Community-acquired pyelonephritis in pregnancy caused by KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*.

Antimicrob Agents Chemother. 59: 4375-8.

Kollef MH. (2000). Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 33: 405–e1-7.

Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T. (2013). MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl*, 7: 767-78.

Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, Peters C, Ahsan M, Chateau D. (2009). Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest*, 136: 1237-48.

Lange C, Schubert S, Jung J. (2014). Quantitative matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid resistance detection. *J Clin Microbiol*, 52: 4155-62.

Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. (2009). Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*, 47: 1611-2.

Lee N, Yuen KY, Kumana CR. (2016). Clinical role of beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations. *Drugs*, 63: 1511-24.

Ling H, Yuan Z, Shen J, Wang Z, Xu Y. (2014). Accuracy of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry for identification of clinical pathogenic fungi: a meta-analysis. *J Clin Microbiol*, 52: 2573-2582.

Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, Bolikas M, Raftopoulos V, Papahatzaki H. (2009). Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella*

*pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect*, 58: 213-219.

Massidda O, Rossolini GM, Satta G. (1991). The *Aeromonas hydrophila* *cphA* gene: molecular heterogeneity among class B metallo-beta-lactamases. *J Bacteriol*, 173: 4611-4617.

Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, Dunn J, Hall G, Wilson D, LaSala P, Kostrzewa M, Harmsen D. (2008). Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Comparison to 16S rRNA Gene Sequencing for Species Identification of Nonfermenting Bacteria. *J Clin Microbiol*, 46: 1946–54.

Montesinos I, Salido E, Delgado T, Cuervo M, Sierra A. (2002). Epidemiologic genotyping of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by pulsed-field gel electrophoresis at a university hospital and comparison with antibiotyping and protein A and coagulase gene polymorphisms. *J Clin Microbiol*, 40: 2119-2125.

Mulvey MR, Simor AE. (2009). Antimicrobial Resistance in Hospitals: How Concerned Should We Be? *Canadian Medical Association Journal*, 180(4): 419-415.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. (2010). *Tıbbi Mikrobiyoloji. Atlas Tıp Kitabevi*, s.301-315.

Nabarro LE, Veeraraghavan B. (2015). Combination therapy for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Increasing evidence, unanswered questions, potential solutions, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34(12): 2307-11.

Nazik H, Poirel L, Nordmann P. (2005). Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae in Turkey.

Antimicrob Agents Chemother, 49(5): 2146-2147.

Noble WC. (1998). Staphylococcus Disease. In: Collier L, Balows A, Sussman M. Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections. 9<sup>th</sup> ed, New York Oxford University Pres, s.1998:231.

Nordmann P, Poirel L. (2002). Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. Clin Microbiol Infect, 8: 321-33.

Octavia S, Lan R. (2014). The Family Enterobacteriaceae. The Prokaryotes pp, s.225-286

Odds FC. (2003). Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. J Antimicrob Chemother, s.52-1.

O'Neill J. (2014). Antimicrobial resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resist, 20: 1–20.

Öztürk R. (2008). Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Ülkemizde Antimikrobik Maddelere Direnç Sorunu. Sempozyum Dizisi, s.1-16.

Özgüneş İ. (2005). Akılcı Antibiyotik Kullanımında Hastane Pratiğinde Sorunlar. ANKEM Derg, 19(2): 185-189.

Pais P, Khurana R, George, J. (2002). Urinary Tract Infections: A Retrospective Survey of Causative Organisms and Antibiotics Prescribed in A Tertiary Care Setting. Indian J Pharm, 34: 278-280.

Patel G, Bonomo RA. (2013). "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. Frontiers in Microbiology, 4(48): 1-17.

- Patel R. (2015). MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. *Clinical Chemistry*, 61(1): 100-111.
- Paul M, Daikos GL, Durante-Mangoni E, Yahav D, Carmeli Y, Benattar YD, Skiada A, Andini R, Eliakim-Raz N, Nutman A, Zusman O, Antoniadou A, Pafundi PC, Adler A, Dickstein Y, Pavleas I, Zampino R, Daitch V, Bitterman R, Zayyad H, Koppel F, Levi I, Babich T, Friberg LE, Mouton JW, Theuretzbacher U, Leibovici L. (2018). Colistin alone versus colistin plus meropenem for treatment of severe infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria: an open-label, randomized controlled trial. *Lancet Infect Dis*, 18: 391–400.
- Pillai SK, Moellering RC Jr, Eliopoulos GM. (2005). Antimicrobial combinations. In: Victor Lorian, ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, s.365-440.
- Pitout JD, Loupland KB. (2008). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis*, 8(3): 159–166.
- Poirel L, Heritier C, Nordmann P. (2004). Chromosome-encoded ambler class D beta-lactamase of *Shewanella oneidensis* as a progenitor of carbapenem-hydrolyzing oxacillinase. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 348-351.
- Poirel L, Heritier C, Nordmann P. (2005). Genetic and biochemical characterization of the chromosome-encoded class B beta-lactamases from *Shewanella livingstonensis* (SLB-1) and *Shewanella frigidimarina* (SFB-1). *J Antimicrob Chemother*, 55: 680-685.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. (2004). Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob*



Agents Chemother, 48: 15-22.

Poirel L, Ozdamar M, Ocampo-Sosa AA, Turkoglu S, Ozer UG, Nordmann P. (2012). NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. Antimicrob Agents Chemother, 56: 2784-2785.

Panos GZ, Betsi GI, Falagas ME. (2006). Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with Escherichia coli O157:H7 infection?. Aliment Pharmacol Ther, 24(5): 731-42.

Pournaras S, Vrioni G, Neou E, Dendrinou J, Dimitroulia E, Poulou A. (2011). Activity of tigecycline alone and in combination with colistin and meropenem against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae strains by time–kill assay. Int J Antimicrob Ajanları. 37: 244–7.

Queenan AM, Bush K. (2007). Carbapenemases: The Versatile  $\beta$ -lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 2(3): 450-458.

Rahi P, Prakash O, Shouche YS. (2016). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Microbial Identifications: Challenges and Scopes for Microbial Ecologists. Front. Microbiol, 30(7): 1359.

Rasmussen BA, Bush K. (1997). Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 41: 223-232.

Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, Henriques I, Alves A, Correia A, Sfh I. (2003). A subclass B2 metallo-beta-lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. Antimicrob Agents Chemother, 47: 2330-2333.

Sarı AN, Çavuş SA, Gülay Z. (2016). Karbapenemaz Üreten *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Rektal Sürüntü Örneklerinden Saptanmasında BD MAXTM CRE Yönteminin Etkinliği. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 46: 112-121.

Seiffert SN, Marschall J, Perreten V, Carattoli A, Furrer H, Endimiani A. (2014). Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. *J Antimicrob Agents*, 44(3): 260-2.

Schwaber MJ, Carmeli Y. (2007). Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, 60: 913–20.

Sparbier K, Lange C, Jung J. (2013). MALDI biotyper-based rapid resistance detection by stable-isotope labeling. *J Clin Microbiol*, 51: 3741-8.

Sparbier K, Schubert S, Weller U. (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Clin Microbiol*, 50: 927-37.

Tängdén T, Giske CG. (2015). Global dissemination of extensively drug-resistant carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. *J Intern Med*, 277: 501-512.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN. (2002). Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial

surveillance programme. J Antimicrob Chemother, 50: 673-679.

Töreci K. (2002). *Escherichia* türleri. İçinde: İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Willke Topçu A, Söyletir G, Doğanay M (Ed.), Nobel Tıp Kitapevleri, s.1564-1574.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonmidis A, Pournaras S. (2008). First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. J Antimicrob Chemother, 62: 1257-1260.

Tülek N. (2001). İnflamatuvar enteritler. İçinde: Güncel bilgiler ışığında infeksiyon hastalıkları. Uzun Ö, Ünal S (Ed.), Bilimsel Tıp Yayınevi, s.481-493.

Ulusoy S. (1999). Antibiyotikler. Solunum Sistemi Enfeksiyonları. Toraks Derg, s.125-163.

Unat EK. (1986). *Escherichia coli*. İçinde: Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi, Dergah Tıp Yayınları, s.546.

Van Duin D, Paterson DL. (2016). Multidrug-resistant bacteria in the community: Trends and lessons learned. Infect Dis Clin North Am, 30: 377-90.

Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V. (2013). Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. J Antimicrob Chemother, 68: 84-88.

Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. (1997). Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother, 41: 1460-1464.

- Walsh TR. (2010). Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*, 36(3): 8-14.
- Walther-Rasmussen J, Hoiby N. (2007). Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*, 60: 470-482.
- Wang L, Han C, Sui W, Wang M, Lu X. (2013). MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemase detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. *Anal Bioanal Chem*, 405: 5259 - 66.
- Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. (1991). Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 35: 147-151.
- Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. (2007). Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 763-765.
- Williams KP, Gillespie JJ, Sobral BWS, Nordberg EK, Smyder EE, Shallom JM, Dickerman AW. (2010). "Phylogeny of Gammaproteobacteria". *J Bacteriol*, 192(9): 2305– 2314.
- Wu Q, Zhang Y, Han L, Sun J, Ni Y. (2009). Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylases in Aminoglycoside Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in *Shanghai*, China. *Antmicrob Agents Chemother*, 53(1): 271-272.
- Wyres KL, Lam MMC, Holt KE. (2020). Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, 18: 344–359.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward

CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4): 1151-61.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K. (2009). Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*, 53:5046-54.



Zarrilli R, Giannouli M, Tomasone F, Triassi M, Tsakris A. (2009). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: the molecular epidemic features of an emerging problem in health care facilities. *J Infect Dev Ctries*, 3(5): 335-341.

Zhang X, Jian Y, Li X, Ma L, Karanis G, Karanis P. (2018). The first report of *Cryptosporidium* spp. In *Microtus fuscus* (Qinghai vole) and *Ochotona curzonia* (wild plateau pika) in the Qinghai-Tibetan Plateau area, China. *Parasitology Research*. 117: 1401-1407.

## EKLER

### Ek 1. Sakarya Üniversitesi Etik Kurulu Onayı

Belge Tarih ve Sayısı: 02/10/2019-E.12306



T.C.  
**SAKARYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ**  
Tıp Fakültesi Dekanlığı

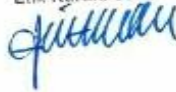
Sayı :71522473/050.01.04/ **271**  
Konu :Girişimsel Olmayan Etik Kurul  
Başvuru Dosyası Hk.

Sayın Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ  
Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İlgi : 16.09.2019 tarihli 271 sayılı başvurunuz.

Destekleyicisi olduğunuz "Kolistin Dirençli Karbapenemaz Üreten Klebsiella  
**Pneumoniae'da Antibiyotiklerin Sinerjistik Aktivitelerinin MALDI TOF İle Belirlenmesi** " isimli  
çalışmanın ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak  
incelenmiş olup; çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen şekilde etik ve bilimsel açıdan sakınca  
bulunmadığına etik kurul üyelerince karar verilmiştir.  
Bilgilerinize rica ederim.





**Prof. Dr. Hasan Çetin EKERBİÇER**  
Etik Kurulu Başkanı

Yücel DEMİR  
Etik Kurulu Sekr.  


Güvenli Elektronik  
İmzalı Aşlı İle Ayarlandı.  
**02.10.2019**

Evrazi Doğrulama İçin : <http://193.140.253.232/envision.Sorgula/BelgeDogrulama.aspx?V=BE8R6559U>

Fakülte Girişimsel Olmayan Etik Kurulu - Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Dekanlığı, Kocucuk Kampüsü, Kocucuk, Adapazarı/Sakarya  
Tel:264 295 6630 Faks:264 295 6629  
E-Posta :tip@sakarya.edu.tr Elektronik Ađ :www.tip.sakarya.edu.tr



# ÖZGEÇMİŞ

## I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Çağlar Yusuf YÜCEDAĞ

Doğum yeri ve tarihi: ALİAĞA-1990

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Bekar

Askerlik durumu: Yaptı

İletişim adresi ve telefonu: Başiskele / KOCAELİ, 05062575706

Yabancı dili: İngilizce

## II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden eskiye doğru)

**1. Yüksek lisans:** Sakarya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji

**2. Ön lisans:** Ordu Üniversitesi İkizce MYO Engelli Bakımı Rehabilitasyonu -  
**Mezun: 04.06.2018**

**3. Lisans:** Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Biyoloji Bölümü – **Mezun:12.01.2015**

**4. Lise:** Farabi Mesleki ve Teknik Anadolu Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı) (İngilizce)  
– **Mezun: 15.06.2008**

**5. İlköğretim:** 50. Yıl İlköğretim Okulu – **Mezun: 15.06.2001**

### **III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden yeniye doğru)**

2015- Biyolog

2018- Sağlık Teknikeri

2019- İş Sağlığı ve Güvenliği Uzmanı

2020- Master of Science (Msc) Medical Microbiology

### **IV- Mesleki Deneyimi**

**1- ÖZEL YÜKSEKOVA DEVLET HASTANESİ** – 2012 Staj – Mikrobiyoloji ve Biyokimya Laboratuvarı Mevcut alanda çalışarak bilgi edinme

**2- Muğla Üniversitesi** – 2011-2013 İş – Moleküler Biyoloji ve Mikrobiyoloji Laboratuvarı

Mevcut alanda çalışarak bilgi edinme ve pratiğe dökme

**3- Ordu Yoğunluk ÇPL Anadolu Lise** - 2015-2016 İş – Matematik Öğretmenliği

Ücretli Öğretmenlik

**4- Ordu Özel Karadeniz Engelli Bakım ve Hizmet Merkezi-** 2016-2017 İş – Sağlık Teknikeri

Mevcut alanda hastanın sağlık sorunlarıyla ilgilenmek

**5- Ordu Ünye Devlet Hastanesi** - 2017-2018 İş – Palyatif bakım, Acil ve Fizik Tedavi ve Rehabiltasyon



## **V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar**

1. Türkiye Biyologlar Derneği
2. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

## **VI- Bilimsel İlgi Alanları**

### **Yayımları:**

### **Makaleler**

1. S Altındış, N Aşıcı, U Şenol, AB Bakır, ÇY Yücedağ, C Demir, R Gün. Transfüzyon Amaçlı Kan Verme Önündeki Engellerin Belirlenmesi Sakarya Tıp Dergisi 9 (2), 237-244

## **VII- Bilimsel Etkinlikleri**

1. Klasik Sistematik Tekniklerle Plantago major L. Olarak Tanımlanabilen (SinirOtu) Bitkisinde DNA İzolasyonu İle 28S ribosomal RNA Gen Haritasıyla Tür Tanımı Ve Antimikrobiyal Aktivitesi Düzeyde İnceleme - TÜBİTAK – 2013

## **VIII- Diğer Bilgiler**

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri

1. Temel Bilgi Teknolojisi Kullanımı (Muğla Üniversitesi Enformatik Bölümü)

2. Microsoft Office programlarını etkin kullanma:

**1) Microsoft Word**

**2) Microsoft Excel**

**3) Microsoft PowerPoint**

**4) Microsoft Outlook**

3. Bilgisayarda Biyoloji Uygulamaları (Muğla Üniversitesi Biyoenformatik Bölümü)

4. Klasik Gitar ve Şan Eğitimi (Muğla Üniversitesi Eğitim Fakültesi Güzel Sanatlar Eğitimi Bölümü / Müzik Eğitimi Anabilim Dalı)

5. Görüntü İşleme Paketleri (Muğla Üniversitesi Enformatik Bölümü) Adobe Photoshop programlarını etkin kullanma

6. Etkili İletişim Stratejileri ve Beden Dili Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 290314100525

7. Satış ve Pazarlama Teknikleri Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 290332102392

8. Mikrobiyoloji Sertifika Programı (Sertifika Press American Association for Higher Education and Accreditation (AAHEA) Onaylı) Sertifika Kodu: 20130620011032

9. Tüketici Davranışları Eğitimi Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 290336102783

10. Genel Muhasebe Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 280317100685

11. Finansal Yönetim Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 280316100628

12. Stratejik Yönetim Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 110434101957

13. İş Güvenliği ve Sağlığı Sertifika Programı (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı) Numara: 29050920170052452851

14. Filografi Tekniği Sertifika Programı (T.C. Milli Eğitim Bakanlığı) Numara: 29050920180054779065

15. Blog Yazarlığı Eğitimi Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü) Sertifika Kodu: 160800380094

16. Python Eğitimi Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü)

17. Yaratıcı Düşünme Teknikleri ve İnovasyon Sertifika Programı (İstanbul İşletme Enstitüsü)

18. T.C. Aile, Çalışma ve Sosyal Hizmetler Bakanlığı - İş Sağlığı ve Güvenliği Genel Müdürlüğü İş Güvenliği C Sınıfı Uzmanlık Belgesi