

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
SUŞLARINDA, KARBAPENEMAZ DİRENCİNİN MATRİKS
DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYONU-UÇUŞ
ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE BELİRLENMESİ**

Abdullah Yücel BABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Metin DOĞAN

KONYA – 2018

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

**KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
SUŞLARINDA, KARBAPENEMAZ DİRENCİNİN MATRİKS
DESTEKLİ LAZER DESORPSİYON/İYONİZASYONU-UÇUŞ
ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE BELİRLENMESİ**

Abdullah Yücel BABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

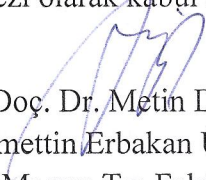
Doç. Dr. Metin DOĞAN

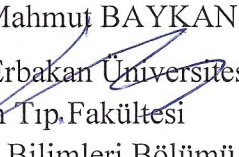
Bu araştırma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü tarafından 181318007 proje numarası ile desteklenmiştir.

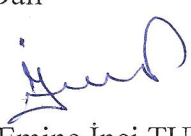
KONYA – 2018

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Abdullah Yücel BABA'nın "Kan Kültürlerinde Üreyen *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında, Karbapenemaz Direncinin Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi ile Belirlenmesi" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.


Doç. Dr. Metin DOĞAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Mahmut BAYKAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Emine İnci TUNCER
Selçuk Üniversitesi
Tıp fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun 05.07.2018 tarih 14/02 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

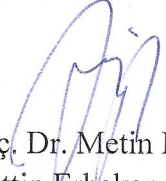
Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Enstitü Müdürü




APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled “Determination of carbapenemase profiles of *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry” by Abdullah Yücel BABA that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of Master of Science in the Department of Medicinal Microbiology, Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan Konya, Turkey/ Date


Doç. Dr. Metin DOĞAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Bilimler Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mahmut BAYKAN
Necmettin Erbakan Üniversitesi
Meram Tıp Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı


Prof. Dr. Emine İnci TUNCER
Selçuk Üniversitesi
Tıp fakültesi
Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan, Institute of Health Sciences.

Prof. Dr. Kısmet Esra NURULLAHOĞLU ATALIK

Director of Institute of Health Sciences



BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 31.05.2018

Öğrencinin Adı Soyadı: Abdullah Yücel BABA

İmzası:



[Gözetim](#)[Öğrenciler](#)[Not Defteri](#)[Kütüphaneler](#)[Takvim](#)[Tartışma](#)[Tercihler](#)

Bu sayfa hakkında

Bu sizin ödev kutunuzdur. Bir yazılı ödevi görüntülemek için yazılı ödevin başlığını seçin. Bir Benzerlik Raporunu görüntülemek için yazılı ödevin benzerlik sütunundaki Benzerlik Raporu ikonunu seçin. Tıklanabilir durumda olmayan bir ikon Benzerlik Raporunun henüz oluşturulmadığını gösterir.

KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN KLEBSIELLA PNEUMONIAESUŞL...

Gelen Kutusu | Görüntüleniyor: yeni ödevler ▼

Dosyayı Gönder Çevrimiçi Derecelendirme Raporu | Ödev ayarlarını düzenle | E-posta bildirmeyenler

[Sil](#) [İndir](#) [Şuraya taşı...](#)

Yazar	Başlık	Benzerlik	web	yayın	student papers	Puanla	cevap	Dosya	Ödev Numarası	Tarih
Abdullah Yücel Baba	2017-2018 Yüksek Lisans tezleri	%10 <input type="text" value="%10"/>	9%	5%	3%	--	--	ödev indir	970350289	30-May-2018

TEŐEKKÜR

Bu tez çalışmasında tez danışmanı hocam Sayın Doç. Dr. Metin DOĞAN, tezimin dışunme aşamasından itibaren tım tez s reci boyunca her aşamada değerli desteklerini esirgememiştir. Bu ons oz vesilesiyle kendisine ve diğer Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı oğretim uyesi değerli hocalarım Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, Sayın Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'na, Dr. Oğr. Üyesi Fatma ESENKAYA TAŐBENT'e teŐekk urlerimi bir borç bilirim.

Tez s recinde yapılan tım çalışmalar ve yazım s reci, her Őeyden once kişisel akademik gelişimim açısından çok faydalı olmuştur. Bu yaklaşık  yıllık bir s ure boyunca bir arada olduğumuz, çalışmalarımda emeği geçen Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından değerli Biyolog Sayın Nizamettin YAKAR'a, Biyolog Sayın Zekeriya TAŐKIN'a ve diğer meslektaşlarıma çok teŐekk ur ederim.

Çalışmalarım boyunca desteklerinden dolayı N.Ü. Meram Tıp Fak ultesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvar çalışanlarına ve Hastanenin tım değerli personeline de teŐekk ur ederim.

Ayrıca, her zaman yanımda olan değerli kardeşim Abdurrahman AYG ÜL'e ve beni destekleyen aileme, yakınlarıma ve tım dostlarıma da teŐekk urlerimi bir borç bilirim.

Y uksek Lisans tezim, Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinat rl ėu tarafından 181318007 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER DİZİNİ

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

ÖZET

ABSTRACT

1. GİRİŞ VE AMAÇ	10
1. GENEL BİLGİLER	12
1.1 <i>Klebsiella</i>	12
1.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	12
1.1.1.1 Epidemiyoloji ve Klinik	13
1.1.1.2 Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları	14
1.2 Beta-laktam Antibiyotikler	15
1.2.1 Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması	15
1.3 Karbapenemler.....	16
1.3.1 İmipenem.....	16
1.3.2 Meropenem.....	16
1.3.3 Ertapenem.....	17
1.3.4 Doripenem.....	17
1.4 Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	17
1.4.1 PBP'lerde Oluşan Değişikliğe Bağlı Direnç	18
1.4.2 Dış Membran Geçirgenliğindeki Değişikliklere Bağlı Direnç.....	18
1.4.3 Beta-laktamaz Enzimlerine Bağlı Direnç.....	19
1.5 Beta-laktamazlar	19
1.5.1 Beta-laktamazların Tarihçesi.....	19
1.5.2 Beta-laktamazların Sınıflandırılması.....	20
1.5.2.1 Moleküler Sınıflandırma (Ambler Sınıflandırması).....	20
1.5.2.1.1 Ambler Sınıf C.....	20
1.5.2.1.2 Ambler Sınıf A.....	20
1.5.2.1.3 Ambler Sınıf B.....	21
1.5.2.1.4 Ambler Sınıf D.....	21
1.5.2.2 Fonksiyonel sınıflandırma (Bush Sınıflandırması).....	21
1.5.2.2.1 Grup 1 beta-laktamazlar.....	21
1.5.2.2.2 Grup 2 beta-laktamazlar.....	21

1.5.2.2.3	Grup 3 beta-laktamazlar.....	22
1.5.2.2.4	Grup 4 beta-laktamazlar.....	23
1.5.3	Karbapenemazlar.....	23
1.5.3.1	Sınıf A Karbapenemazlar	23
1.5.3.2	Sınıf B Metalloenzimler	24
1.5.3.3	Sınıf D Karbapenemazlar	25
1.5.3.4	Karbapenemaz Varlığını Doğrulama Yöntemleri.....	26
1.5.3.4.1	Fenotipik Yöntemler	26
1.5.3.4.2	Modifiye Hodge gradiyent testi (MHT).....	26
1.5.3.4.3	Çift Disk Sinerji Testi	27
1.5.3.4.4	Kombine disk diffüzyon testi.....	27
1.5.3.4.5	Gradyent test yöntemi.....	28
1.5.3.4.6	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS).....	28
1.5.3.5	Genotipik Yöntemler	31
2.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	32
2.1	Gereç.....	32
2.1.1	Kullanılan Bakteriler	32
2.1.2	İnokülasyonun Hazırlanması.....	32
2.1.3	MALDI-TOF Kütle Spektrometresi.....	33
3.	BULGULAR.....	35
4.	TARTIŞMA.....	36
5.	KAYNAKÇA.....	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan Modifiye Hodge gradiyent testi.

Şekil 2. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan ift Disk Sinerji Testi.

Şekil 3. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan Kombine disk diffüzyon testi.

Şekil 4. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan Gradiyent test yöntemi.

Şekil 5. MALDI TOF MS alıŐma prensibi.

Şekil 6. Bakterilerin tanımlanması.

Şekil 7. MALTI TOF MS diyagramı: dirençli izolata örnek.

Şekil 8. MALTI TOF MS diyagramı: duyarlı izolata örnek.

Şekil 9. Negatif kontrolün (sadece meropenem) MALDI TOF MS diyagramı.

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ

6-APA: 6-aminopenisilanik asit

CDC: Birleşmiş Milletler Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri

EDTA: Etilendiamin tetra asetik asit

ESBL: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar

HCl: Hidroklorik asit

IMP: İmipenemaz

İYE: İdrar yolu enfeksiyonları

KPC: *K.pneumoniae* karbapenemaz

MALDI-TOF MS: Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu-uçuş zamanı kütle spektrometresi

MBL: Metallo-beta-laktamazlar

MHT: Modifiye Hodge gradiyent testi

MİK: Minimum inhibisyon kansantrasyonu

MRSA: Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*

NaCl: Sodyum klörür

OXA: Oksasilin hidrolize eden karbapenemaz

PBP: Penisilin bağlayan protein

RFLP: Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

TMP-SMX: Trimetoprim-sülfametoksazol

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
KAN KÜLTÜRLERİNDE ÜREYEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* SUŞLARINDA,
KARBAPENEMAZ DİRENCİNİN MATRİKS DESTEKLİ LAZER
DESORPSİYON/İYONİZASYONU-UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ İLE
BELİRLENMESİ

Abdullah Yücel BABA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Metin DOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ/ KONYA-2018

ÖZET

Enterobacteriaceae ailesinde yer alan *Klebsiella pneumoniae*, gastrointestinal florada normal olarak bulunur ve genellikle hastane enfeksiyonlarına neden olur. *K.pneumoniae* dahil olmak üzere genel olarak beta-laktam antibiyotiklerle tedavi edilen enterobakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi, bu patojenlerin sentezledikleri beta-laktamaz enzimleri nedeniyle güçleşmektedir. Ülkemiz başta olmak üzere, karbapenemaz sentezleyen enfeksiyon etkenlerinde son yıllarda ciddi bir artış yaşanmaktadır. Mortalite ve morbidite artışına neden olan karbapenem dirençli mikroorganizmalar tedavi sürecinin daha maliyetli ve uzun olmasına sebep olabilmektedir. Dolayısıyla, karbapenemaz üreten klinik izolatların doğru bir şekilde identifikasyonu, bu izolatlarla oluşan enfeksiyonların tedavisi, direnç genlerinin yayılımının önlenmesi ve hastane enfeksiyonlarını engellemesi için oldukça önemlidir. Bu izolatların tanımlanması için Modifiye Hodge gradient testi (MHT), Çift Disk Sinerji Testi gibi konvansiyonel yöntemlerle birlikte moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) bu alanda yeni kullanılmaya başlayan ve geliştirilmeye çalışılan yöntemlerdendir. Karbapenemaz direncinin araştırılmasında MALDI-TOF MS, konvansiyonel yöntemlere göre daha hızlı sonuç veren bir yöntem olup bu tanı testinin etkinliğinin araştırılması, laboratuvarlarda kullanımının standardize edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilen karbapeneme duyarlı olan ve olmayan *K. pneumoniae* izolatları kullanılmıştır. Dirençli izolatlarda karbapeneme direncin genotipik olarak en sık OXA-48 genine bağlı olduğu tespit edilmiştir. Genotipik direnç genine sahip 96 izolatın MALDI-TOF MS analizlerinde 88'inin dirençli olduğu gözlenmiş, 3'ünün ise dirençli olduğu tespit edilememiş duyarlı gibi değerlendirilmiştir. 5 izolat için dirençli veya duyarlı yorumu yapılamamıştır. Bu yöntemin karbapeneme direncin belirlenmesinde %96,7 duyarlılığa sahip olduğu, özgüllüğünün %100 olduğu, Pozitif Prediktif Değer (PPD)'in %100 olduğu ve Negatif Prediktif Değer (NPD)'in %93 olduğu belirlenmiştir.

İdentifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarında kullanılmaya başlanan MALDI-TOF MS, bu alanda oldukça yeni bir uygulamadır. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında identifikasyon için rutin olarak kullanılmaya başlanan tekniğin avantajı, geleneksel identifikasyon yöntemlerine göre oldukça hızlı sonuç vermesidir. Buna karşın, özellikle antimikrobiyal duyarlılık tespitinde, geleneksel yöntemlere göre özgüllük ve duyarlılığının ortaya konması için çalışmalara ihtiyaç vardır. Ekstraksiyonda kullanılan solüsyonlar, analizde kullanılacak olan antibiyotik ve inkübasyon süreleri ile ilgili çalışmalar çeşitlendirilerek MALDI TOF MS yönteminin optimize edilmesi, laboratuvar tanısında ve özellikle karbapenemaz tespitinde önemli dönüm noktalarından biri olacaktır. Böylelikle yöntem daha yaygın bir kullanım alanına sahip olabilecektir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*; Karbapenemaz; MALDI TOF MS.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae, including in the *Enterobacteriaceae* family, is normally present in the gastrointestinal flora and usually causes nosocomial infections. The treatment of infections caused by enterobacteria, including *K.pneumoniae*, generally treated with beta-lactam antibiotics, is complicated because of the beta-lactamase enzymes synthesized by these pathogens. In recent years, there has been a serious increase in the agents causing infection by carbapenemase producing microorganisms, especially in our country. Carbapenem-resistant microorganisms, which cause increasing mortality and morbidity, cause the treatment period to be costlier and longer. Accurate identification of clinical isolates producing carbapenemase is therefore crucial for the treatment of infections, the prevention of the spread of resistance genes and the prevention of hospital infections with these isolates. Various methods such as Modified Hodge gradient test (MHT), Dual Disk Synergy Test and molecular methods have been used for the identification of these isolates. Matrix assisted laser desorption / ionization-flight time mass spectrometry (MALDI-TOF MS) that are tried to be developed has been used for the identification of research of producing the carbapenemase of these isolates for in recent years. MALDI-TOF MS is a faster method than conventional methods in the investigation of producing the carbapenemase. To effectiveness of this diagnostic test and to standardize its use in laboratories should be investigated.

In this study, carbapenem susceptible and non-susceptible *K.pneumoniae* strains isolated Meram Medical Faculty Hospital Medical Microbiology Laboratory of Necmettin Erbakan University were used. In resistant isolates, most of the carbapenem resistance was genotypically associated with the OXA-48 gene. In the MALDI-TOF MS analyzes of 96 isolates with genotypic resistance, 88 were resistant and 3 were susceptible. 5 isolates could not be assessed resistant or sensitive by this method. It was determined that this method had the sensitivity of 96.7%, the specificity of 100%, the Positive Predictive Value (PPV) of 100%, and the Negative Predictive Value (NPV) of 93% in determining of producing the carbapenemase.

MALDI-TOF MS, which is being used for identification and antibiotic susceptibility studies, is a quite new application in this field. The advantage of the

technique that is being routinely used for identification from microbiology laboratories is that it is very fast in comparison with traditional identification methods. However, there is a need in recent years for the detection of specificity and sensitivity in detecting antimicrobial susceptibility compared to conventional methods. Optimization of the MALDI TOF MS method will be one of the important milestones in laboratory diagnosis and especially in the detection of carbapenemase by diversifying the studies on the solutions used in the extraction, antibiotics and incubation periods to be used in the analysis. Thus, the method may have a wider application area.

Key words: Carbapenemase; *Klebsiella pneumoniae*; MALDI TOF MS.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klebsiella pneumoniae, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan *Klebsiella* cinsine ait bir türdür. *Klebsiella* cinsi gastrointestinal floranın bir elemanı olup önemli hastane enfeksiyonları arasındadır. Fırsatçı patojenler arasında yer alan bu türler, genellikle bağışıklığı zayıflamış hastalarda enfeksiyona neden olur (Bagley 1985). Bu cins içerisindeki en önemli tür olan *Klebsiella pneumoniae*, sıklıkla hastane kaynaklı üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, sepsisler ve yumuşak doku enfeksiyonlarına neden olur. Sağlık çalışanlarının elleri, mekanik solunum cihazları, kataterler ve cerrahi yaralar *Klebsiella* enfeksiyonları için zemin hazırlayan önemli predispozan faktörlerden olup fekal-oral bulaş söz konusu olabilmektedir (Gupta 2002; Seibert ve ark., 2014).

Beta-laktamaz ekspresyonu Gram negatif bakterilerdeki beta-laktam antibiyotiklere direnç gelişiminin en önemli nedenidir. Beta-laktamazlar ve karbapenemazlar iyi bilinen enzimlerdendir. Özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde karbapenemaz üreten izolatlar açısından son yıllarda ciddi bir artış yaşanmıştır (Adler ve ark., 2016).

Karbapenemler, en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerden olup mikroorganizmaların karbapenemlere karşı direnç geliştirmesinden dolayı tedavideki seçenekler kısıtlanmaktadır. Karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar Ambler sınıflaması içerisinde sınıf A, B ve D'de yer almaktadır. Ambler sınıf A'da ilk tanımlanan karbapenemazlardan olan *K.pneumoniae* karbapenemaz (KPC) yer alır. KPC plasmid aracılığıyla aktarılır (Jarvis ve ark., 1985). Sınıf B'de, Verona integron-kodlu metallo-beta-laktamaz (VIM) ve imipenemi hidrolize eden beta-laktamaz (IMP) bulunurken, oksasilin hidrolize eden karbapenemaz (OXA) enzimleri sınıf D'de yer alır. OXA grubunda en iyi bilinen enzim olan OXA-48 ülkemizde ve dünya genelinde yaygın olarak bulunur (Çiftçi ve ark. 2013; Nordmann ve ark., 2011). Yakın zamanda *Enterobacteriaceae* ve non-fermentatif basillerde yeni karbapenemazlar bildirilmiştir (Nordmann ve ark.,2011).

Mortalite ve morbidite artışına neden olan karbapenem dirençli mikroorganizmalar tedavi sürecinin daha maliyetli ve uzun olmasına sebep olabilmektedir. Bununla birlikte karbapenem direncinin artması bu enfeksiyonların tedavisi için gerekli olan antibiyotik alternatiflerinin azalması ve hatta tükenmesi ile

direncin hızlı bir şekilde yayılmasına ortam hazırlamaktadır. Ülkemizde karbapenemaz üreten *Klebsiella* türlerinin oluşturduğu enfeksiyonlardaki artış hızının dünyanın diğer bölgelerine oranla daha yüksek olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (Kılıç ve Baysallar 2015; Karabay ve ark.2016; Nordmann ve ark.,2011).

Karbapenemaz üreten klinik izolatların identifikasyonu, bu izolatlarla oluşan enfeksiyonların tedavisi, direnç genlerinin yayılımının önlenmesi ve hastane enfeksiyonlarını engellemesi için gereklidir (Endimiani ve ark., 2009). Karbapenemaz üreten bakterilerin tanımlanması için Modifiye Hodge gradiyent testi (MHT), Çift Disk Sinerji Testi gibi konvansiyonel yöntemlerle birlikte moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu-uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) bu alanda yeni kullanılmaya başlayan ve geliştirilmeye çalışılan yöntemlerdendir (Livermore ve Brown2001; Ikryannikova ve ark., 2008). Bu çalışmada, kan kültürlerinde üreyen *K.pneumoniae* suşlarında, karbapenemaz direncinin, mikrobiyoloji laboratuvarlarında identifikasyonda kullanılmaya başlanan ve diğer metotlardan daha kısa sürede sonuç verebilen MALDI-TOF MS tekniği ile belirlenmesi amaçlanmıştır.

1. GENEL BİLGİLER

1.1 *Klebsiella*

Klebsiella cinsi, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olan *Klebsiellae* alt ailesine aittir. *Klebsiella*, ismini 19. yüzyılda yaşamış Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'den almıştır (Broberg ve ark., 2014).

Klebsiella'lar, belirgin bir polisakarit kapsülü olan, hareketsiz, çubuk şeklinde, Gram negatif bakterilerdir. Polisakarit yapıdaki kapsül en önemli virülans faktörlerinden olup fagositoz başta olmak üzere, birçok konak savunma mekanizmasına karşı direnç gelişiminde rol almaktadır ve kapsül boyama yöntemleriyle incelenebilir (Podschun ve Ullmann 1998; Edwards ve Ewing 1986).

Klebsiella cinsi üyeleri tipik olarak hücre yüzeyinde 2 tip antijen açığa çıkarırlar. Birincisi bir lipopolisakarid (O antijeni); diğeri ise kapsüler bir polisakarittir (K antijeni). Bu antijenlerin her ikisi de patojeniteye katkıda bulunur. Yaklaşık 77 K antijeni ve 9 O antijeni vardır. Bu antijenlerin yapısal değişkenliği çeşitli serotiplere sınıflamanın temelini oluşturmaktadır. İnsanlarda, *K.pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Klebsiella granulomatis* türleri hastalık ile daha çok ilişkilendirilmektedir (Hoppe ve ark., 2014; Boye ve Hansen 2003).

Daha önce *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella rhinoscleromatis* olarak bilinen organizmalar, *K.pneumoniae*'nin fermentatif olmayan alttürleridir. Bu istisnalar dışında, *Klebsiella* cinsi laktoz pozitif, çoğunlukla yoğun bir polisakarit kapsül sentezi nedeniyle plak besiyerlerinde mukoid koloniler üreten, hareketsiz bakterilerdir. Son yıllarda, *Klebsiella* üyeleri nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli patojenler haline gelmiştir (Botelho-Nevers ve ark., 2007; Paczosa ve Mecsas 2016).

1.1.1 *Klebsiella pneumoniae*

Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan *K.pneumoniae*, kapsüllü, laktoz pozitif ve Gram negatif bir basildir. Özellikle bağışıklık sistemi zayıf olan bireylerde olmak üzere, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilmektedir. Ayrıca; ağız, cilt ve bağırsak florasında, hastane ortamlarında ve tıbbi cihazlardan yaygın olarak izole edilebilen fırsatçı bir patojendir (Li ve ark., 2014).

1.1.1.1 Epidemiyoloji ve Klinik

K.pneumoniae, akciğerlerde ve diğer organlarda enfeksiyonlar oluşturabilmekte ve yıkıcı değişikliklere neden olabilmektedir. Yatan hastalarda yaygın olarak, idrar yolu, alt solunum yolu, safra yolu ve cerrahi yara bölgelerini içeren çeşitli klinik enfeksiyonlara neden olabilmektedirler. Klinik semptomları nonspesifiktir. Enfeksiyon bölgesine göre, pnömoni, bakteriyemi, tromboflebit, idrar yolu enfeksiyonu (İYE), kolesistit, diyare, üst solunum yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu, osteomyelit, menenjit ve sepsis gibi tablolara neden olabilir. İnvaziv cihazların varlığı, solunum destek ekipmanının kontaminasyonu, idrar sondası ve antibiyotik kullanımı, *Klebsiella* türleri ile nozokomiyal enfeksiyon olasılığını artıran faktörlerdendir (Martin ve Bachman 2018).

K.pneumoniae, hastane kaynaklı tüm enfeksiyonların yaklaşık %8'inden sorumludur. Yaşlı kişilerde toplum kökenli pnömoninin önemli bir nedenidir. Malezya ve Japonya'da yapılan araştırmalar, yaşlılarda pnömoni insidans oranını %15-40 olarak tahmin etmektedir. *Klebsiella* türlerinin Amerika'da tüm patojenik salgın hastalıkların %3'ünden sorumlu olduğunu bildirilmektedir (Nordmann ve ark., 2011).

Avrupa ülkeleri arasında karbapenemaz tiplerinin yayılımı açısından ülkemiz, OXA48 tip karbapenemazlar açısından endemiktir. Ayrıca, ülkemizde NDM-1 tip karbapenemazlar açısından hızlı bir yayılımın söz konusudur ve VIM barındıran izolatlar hastanelerde sıklıkla salgınlara neden olmaktadır. Yapılan çeşitli araştırmalarda NDM için Hindistan, Amerika Birleşik Devletleri, İsrail, Yunanistan ve İtalya; KPC için Hindistan ve OXA-48 için Türkiye ve Kuzey Afrika ülkeleri odak merkezi olarak rapor edilmiştir. OXA-48 ülkemizde ilk olarak 2003 yılında saptanmıştır ve yoğun olarak bildirilmeye devam etmektedir (Nordmann ve ark., 2011; Nordmann 2014).

K.pneumoniae, dolaşım sistemi enfeksiyonlarında önemli bir etkidir. Kan kültürlerinden yüksek oranlarda izole edilmektedir. Ayrıca, kan ve dolaşım sistemi enfeksiyonları ile ilişkili izolatların büyük kısmının karbapenemlere dirençli olduğu sıklıkla gözlenmektedir. Karbapenemlere dirençli olan *K.pneumoniae* izolatlarının genellikle klinik olarak önemli antibiyotiklere karşı da oldukça geniş bir yelpazede dirençli olduğu gözlenmektedir. Dahası, bu izolatlar sıklıkla OXA-48 karbapenemazı

taşımaktadır (Iraz ve ark. 2015; Nordmann ve ark., 2011). NDM-1 taşıyan *K.pneumoniae* izolatları kan dolaşımı enfeksiyonlarıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmiştir (Poirel ve ark., 2015).

Özellikle karbapeneme dirençli *Klebsiella* türleri başta olmak üzere, karbapeneme dirençli mikroorganizmaların neden olduğu salgınların ve sporadik olguların ülkemizde giderek arttığı rapor edilmektedir. Antibiyotiğe dirençli *Klebsiella* salgınlarındaki artış mortalite ve morbiditede artışa, hospitalizasyonun uzamasına ve tedavi maliyetlerinin artmasına neden olmaktadır (Emonet ve ark., 2010). Porin kaybı ya da efluks pompalarının işlevlerindeki değişiklik antibiyotiklere karşı direnç gelişimine ılımlı seviyelerde katkıda bulursa da, karbapenem direncinin gelişmesinde temel mekanizma karbapenemaz sentezidir. Karbapenemaz üretimiyle gelişen dirençte, enzimi kodlayıcı genleri taşıyan plazmidler aracılığıyla direnç yayılımı horizontal olarak hızla gerçekleşebilmektedir. Uygun tedavinin belirlenebilmesi ve direnç yayılımının önüne geçilebilmesi açısından, karbapenemaz sentezleyen kökenlerin doğru şekilde saptanması önemlidir. Bu durum, ülkemizin de dahil olduğu, karbapenem direnci yönünden endemik bölgelerde direncin saptanmasının önemini daha da artırmaktadır (Demiray ve ark., 2017).

1.1.1.2 Tedavide Kullanılan Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Enterobacteriaceae üyelerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi enfeksiyon bölgesine göre değerlendirilerek belirlenir. *K.pneumoniae* pnömonisi ve İYE’da kullanılan başlıca antibiyotikler 3. kuşak sefalosporinler, karbapenemler gibi beta-laktam antibiyotikler ve florokinolonlardır. İdrar yolu enfeksiyonlarında genel olarak trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX), nitrofurantoin ya da fosfomisin gibi antibiyotikler de kullanılabilir. Florokinolonlarda siprofloksasinin idrardaki birikiminin daha fazla olması sebebiyle İYE tedavisinde tercih edilirken, levofloksasin pnömoni tedavisinde kullanılmaktadır (Bassetti ve ark. 2018, Porreca ve ark., 2018).

Beta-laktam antibiyotiklere karşı son yıllarda gelişen yaygın dirençten dolayı ve özellikle de karbapenemaz taşıyan bakteriyel patojenlerin yaygınlaştığı dikkate alınır, bu tür bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyogramın belirlenmesi önemlidir. *K.pneumoniae* ve diğer karbapenemaz taşıyan patojenlerde kolistin, polimiksinler, aminoglikozitler, tigesiklin gibi genellikle son seçenek

antibiyotiklerin kullanılması gerekebilmektedir. Karbapenem kombinasyonları, seftazidim/avibaktam, meropenem–vaborbaktam gibi yeni kombinasyonlar da çoklu ilaca dirençli olgulara karşı son yıllarda giderek popüler hale gelmektedir (Boyle ve Zembower 2015; Porreca ve ark., 2018).

Söz konusu tedavi stratejileri etkililik, yan etki, fiyat gibi unsurlar göz önüne alınarak değerlendirilmelidir. Karbapenemler dahil olmak üzere beta-laktam antibiyotikler kolay bulunabilir ve güvenilir olmasına rağmen, beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten mikroorganizmalara karşı etkisiz kalmaktadır. Bu tür mikroorganizmalara kolistin ve polimiksin gibi antibiyotikler etkili olsa da, nefrotoksisite gibi yan etkileri dolayısıyla kullanımı kısıtlı antibiyotiklerdendir. Benzer şekilde aminoglikozit kullanımına bağlı nefrotoksisite ve ototoksisite bu ajanların kullanımını kısıtlamaktadır. Gram pozitif bakterilere karşı kullanılabilen glikopeptidler, streptograminler, linezolid vb. yeni ve etkili seçenekler bulunmasına rağmen Gram negatiflerde tedavi seçeneği daha kısıtlıdır (Bassetti ve Righi 2015; Bassetti ve ark., 2018).

1.2 Beta-laktam Antibiyotikler

Bakteri hücre duvar sentezini inhibe eden beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etkilidirler. Bu grup antibiyotikler, üç karbon ve bir azot olmak üzere 4 üyeli ‘beta-laktam’ halkası içerirler. Monobaktamlar hariç, bu halkalara 6-amino penisilanik asid (6-APA) adında bir halka daha eklenmiştir. Bununla birlikte, farklı zincirlerin eklenmesi ile molekül yapıları farklılaşmış olan beta-laktam anibiyotikler 5 grupta incelenir (Ghosh ve ark., 2006):

- 1- Penisilinler
- 2- Sefalosporinler
- 3- Monobaktamlar
- 4- Karbapenemler
- 5- Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam, vs.)

1.2.1 Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta-laktam antibiyotikler; bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu olan transpeptidazı (penisilin bağlayan protein-PBP) etkisiz hale getirip peptidoglikan sentezini engelleyerek etki gösterirler. Bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan

tabakasında bulunan çapraz bağlı peptit zincileri D-alanin moleküllerinin transpeptidasyonu ile oluşur. PBP'ler, transpeptidasyon reaksiyonunu oluşturan enzimlerdir. Antibiyotiklerin amacı PBP ile reaksiyona girmek ve D-alanin'in yerine geçerek transpeptidasyonu engellemektir. Hücre duvarını sentezleyemeyen bakteri yıkıma uğrar. Dolayısıyla beta-laktam antibiyotikler bakterisidaldir (Ulusoy 2004).

1.3 Karbapenemler

Geniş bir etki spektrumuna sahip olan karbapenemler bakterisidal etki gösterir ve beta-laktam antibiyotiklerdendir. Peptidoglikan sentezine etki ederler. *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacteriaceae* üyelerine ve ayrıca beta-laktamaz üreten *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium avium intracellulare* ve *Neisseria gonorrhoea*'ya etkilidirler. Yaygın olarak bilinen karbapenemler imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenemdir. (<http://acikerisim.deu.edu.tr> 01 Nisan 2018).

1.3.1 İmipenem

Karbapenemler içerisinde en geniş etki spektruma sahip olan imipenem aerop, anaerop, Gram negatif ve Gram pozitif mikroorganizmalara etkilidir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin PBP'lerine bağlanır. Molekül ağırlığı yüksek olan PBP'lere bağlanan imipenemin Gram negatif bakterilerin hücre duvarına penetrasyonu diğerine göre daha fazladır. Etki ettiği mikroorganizmaların birçoğu için minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) 4 mg/L'nin altındadır. Klinik olarak önemli olan bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonlarda ve monoterapötik ajan olarak farklı antibiyotiklere göre daha etkilidir (Butler ve ark., 2013).

Birçok beta-laktamazın hidrolizine karşı dayanıklı olan imipenem, Gram negatif bakterilerin karbapenemazları ve stafilokok enzimlerinin hidrolizine dayanıklılık gösteremezler. Mikroorganizmalara karşı direnç gelişimi diğer bir karbapenem olan imipeneme göre daha düşüktür (Fair ve Tor 2014).

1.3.2 Meropenem

Meropenem'in etki spektrumu birçok Gram pozitif bakteri, *Pseudomonas*'lar dahil Gram negatif bakteri ve anaerobik bakterileri kapsamaktadır. Diğer beta-laktamların aksine, beta-laktamazlar veya sefalosporinazlar tarafından hidrolize karşı oldukça dirençlidir. Genel olarak, PBP'de mutasyonlar, metallo-beta-laktamaz

üretimi veya Gram negatif bakterilerde dış membranın fiziksel bir bariyer gibi işlev görmesi nedeniyle direnç ortaya çıkar (Page ve Bush 2014).

Meropenemin etki spektrumu imipenem'e benzer olup başlıca hedefi PBP-2'dir ve DHP-I hidrolizine karşı dayanıklıdır (Sully ve ark., 2017).

1.3.3 Ertapenem

1-β-metil grubuna sahiptir; dolayısıyla yapısal olarak meropeneme benzerdir. Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere etkilidir, ayrıca anaerobik bakterilere karşı klinik etkinliğe sahiptir. Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), ampisilin dirençli enterokoklar, *P.aeruginosa* veya *Acinetobacter* türlerine karşı etkili değildir (Papp-Wallace ve ark., 2011).

Ertapenem dışındaki karbapenem grubunun diğer üyeleri (imipenem, doripenem ve meropenem), tedavi edilmesi zor olan enfeksiyonlarda yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerdir (Pillai ve ark., 2009).

1.3.4 Doripenem

Doripenem, karbapenem grubuna ait bir beta-laktam antibiyotik olup Gram negatif bakterileri de içeren geniş bir etki spektrumuna sahiptir. Kompleks abdominal enfeksiyonların, hastane kaynaklı pnömoninin ve septiseminin eşlik ettiği pyelonefrit dahil olmak üzere İYE'nin tedavisinde kullanılabilir (Zhanel ve ark., 2009).

Genişlemiş spektrumlu olanlar dahil beta-laktamazlara karşı stabildir, ancak karbapenemazların etkisine açıktır. Doripenem ayrıca *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı diğer karbapenemlere göre daha aktiftir (Pillai ve ark., 2009).

1.4 Beta-laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotikler toplum ve hastane kökenli enfeksiyonlar için yaygın olarak kullanılır. Bu yaygın kullanımla birlikte bakterilerin bu antibiyotiklere çeşitli direnç mekanizmaları geliştirdiği ve buna bağlı olarak direnç oranlarının arttığı gözlenmektedir (Medeiros 2000).

Bakteriler genel olarak 3 şekilde direnç mekanizması geliştirebilir (Medeiros 2000; Page ve Bush 2014):

- 1) Antibiyotiğin hücre içine etkin miktarda ulaşımının engellenmesi.

- 2) Hedefin yapısında değişiklik.
- 3) Antibiyotiği hidrolize eden enzimlerin sentezlenmesi.

Gram negatif bakterilerde direnç geliştirme mekanizması bu üç mekanizma ile ortaya çıkabilir. Gram pozitif bakterilerde ise hücre duvar yapısı farklı olduğu için daha çok PBP yapısında değişiklik şeklinde direnç gelişimi gözlenir (Siegel ve ark., 2007).

1.4.1 PBP'lerde Oluşan Değişikliğe Bağlı Direnç

Mikroorganizmaların meydana getirdiği beta-laktam direncinde önemli bir mekanizma da PBP yapısındaki değişim olup daha çok kromozomal mutasyonların sonucunda PBP'lerin yapısında değişiklik meydana getirir ve bu şekilde afiniteleri azalan PBP'ler sayı olarak da azalır. Bundan dolayı yeni sentezlenen PBP'lerin afiniteleri düşüktür. Bu mekanizma bazı Gram pozitif bakterilerde ve *Pseudomonas*'larda gözlenmiştir (Medeiros 1997).

1.4.2 Dış Membran Geçirgenliğindeki Değişikliklere Bağlı Direnç

Gram pozitif bakterilerde dış membran bulunmadığından beta-laktamlara permeabilite engeli yoktur. Dolayısıyla dış membran geçirgenliğindeki değişikliklere bağlı direnç görülmez. Gram negatiflerde ise dış membrana sahip olduğu için bunun tersi bir durum söz konusudur. Çünkü dış membran beta-laktamlara doğal bir engel teşkil etmektedir. Direnç gelişimi; beta-laktam antibiyotiklerin geçmek zorunda oldukları porin proteinlerinin kromozomal mutasyona uğramasıyla geçirgenliğin azalması şeklinde ortaya çıkmaktadır. Bu şekilde sefalosporinler, penisilinler ve karbapenemlere karşı direnç gelişmektedir. *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bu tip direnç gelişiminin olduğu bildirilmiştir (Sanders 1992).

Dış membran geçirgenliğindeki değişikliklere bağlı olarak gelişen bir başka direnç ise aktif pompa sistemidir. Bu sistem antimikrobiyal ajanların atılmasını sağlar ve bu şekilde beta-laktamlarda dahil birçok antibiyotiğe karşı doğal veya kazanılmış direnç gelişimine neden olur. Gram negatif bakterilerin antibiyotiklere karşı doğal dirençlerindeki temel nedenin aktif pompa sistemi olduğu ortaya konulmuştur (Philippon ve ark., 2002).

1.4.3 Beta-laktamaz Enzimlerine Bağlı Direnç

Özellikle patojenik etkiye sahip Gram negatif bakterilerin ve *Enterobacteriaceae* üyelerinin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizmalarından en önemlisi beta-laktamaz sentezidir. Beta-laktamazlar bakteriler tarafından kromozom, plazmid veya transpozonlar aracılığı ile kodlanır. Bakteri kökenli olan bu enzimler Gram negatif bakterilerin periplazmik boşluklarında bulunur. Beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklerdeki amid bağlarını etkisiz hale getirerek antibiyotiği inhibe eden enzimlerdir (Spadafino ve ark., 2014).

1.5 Beta-laktamazlar

1.5.1 Beta-laktamazların Tarihçesi

Beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklerin sahip olduğu beta-laktam halkasındaki amid bağına parçalayarak antibiyotiği hidrolize eden enzimlerdir (Özsoy 2001).

1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin bulunmasından sonra Abraham ve Chain (1940)'in gerçekleştirdikleri çalışmada, ilk defa *E. coli*'nin penisiline direnç geliştirdiğini göstermişlerdir. Penisilinin etkisini ortadan kaldıran bu enzime "penisilinaz" ismini vermişlerdir (Gür 1997). Kriby (1940), Stafilokokların penisiline dirençli ve duyarlı suşlarını karşılaştırmış ve dirençli olanlarında beta-laktamazların bulunduğunu tespit etmiştir. Beecam ve ark. (1950)'nin gerçekleştirdikleri çalışmada 6-aminopenisiloid asitten yarı sentetik penisilin sentezlenmiş ve bunu takiben metisilin, ampisilin, sefaloridin ve sefalotini geliştirilmiştir. Gram negatif bakterilerde direnç artışı daha hızlı gerçekleşmiştir. Bu durum Gram negatif bakteriler arasında beta-laktamazların plazmid kontrolünde sentezlenmesi ve direnç genlerinin konjugasyonla aktarılmasından kaynaklanmaktadır (Jacoby ve ark., 1988).

Günümüze kadar geçen süreçte pek çok beta-laktamaz tanımlanmıştır. 1980'lerden günümüze kadar devam eden 40 yıllık süreçte substrat profili, inhibitöre duyarlılık, hidrolitik etkinlik ve moleküler yapılarına göre sınıflandırılan beta-laktamazlar, beta-laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımından dolayı yaygınlaşmıştır. Günümüzde geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL) ve karbapenemazlar ön plana çıkmaktadır (Giske ve ark., 2009).

1.5.2 Beta-laktamazların Sınıflandırılması

Günümüzde beta-laktamazlar için iki sınıflandırma şeması kullanılmaktadır. Bunlardan ilki Ambler (1980) tarafından ortaya konulan moleküler sınıflandırma, enzimleri kodlayan nükleotid ve aminoasit dizilimlerine göre yapılmıştır. Bu sisteme göre enzimler A, B, C ve D gruplarına ayrılmıştır. Bush ve ark. (1995) tarafından geliştirilen fonksiyonel sınıflandırma, Ambler sınıflandırmasının güncellenmiş halidir ve beta-laktamazları 4 sınıfa ayırır.

1.5.2.1 Moleküler Sınıflandırma (Ambler Sınıflandırması)

1.5.2.1.1 Ambler Sınıf C

Bu grup klavulanat gibi beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidir ve çoğunlukla kromozomlar tarafından kodlanırlar. AmpC enzimleri olarak da bilinir. Ortamdaki substrat varlığıyla doğru orantılı olarak bu enzimler indüklenebilir. Bu nedenle, bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere maruz kalması, enzim üretiminde artışa neden olur (Nordmann ve ark., 2011). Beta-laktam antibiyotikler farklı olduğundan, farklı seviyelerde beta-laktamaz üretimini uyarırlar. Grup I'deki enzimler, *Enterobacteriaceae* ailesinin yanı sıra *P. aeruginosa*'da da bulunur (Ambler ve ark., 1991).

Grup 1 beta-laktamazlar, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları, penisilinleri, sefamisinlerde dahil 1. 2. ve 3. kuşak sefalosporinlere dirençlidir. Sefepime ve karbapenemlere duyarlıdırlar (Siegel ve ark., 2007).

1.5.2.1.2 Ambler Sınıf A

Grup 2'ye sınıflandırılan enzimler, plazmid aracılı taşındığından, farklı bakteriyel hücrelere kolaylıkla iletilebilmektedir. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri grup 2 enzimlerini inhibe eder (De Champs ve ark., 1991). Ana grup 2 enzimleri TEM ve SHV'dir. TEM-1 ilk olarak 1965 yılında *Enterobacteriaceae* ailesinde tanımlanmıştır. Sonrasında *Haemophilus*, *Neisseria* ve *Vibrio* türlerine yayıldığı tespit edilmiştir. SHV-1 ise 1979 yılında keşfedilmiştir ve yine benzer türlere yayıldığı gözlenmiştir. Yaygın olarak *Klebsiella spp.* ve *E. coli*'de bulunur (Ghafourian ve ark., 2015). Moleküler olarak Ambler sınıf A da temsil edilen grup 2 enzimleri, ampisilin, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler ve monobaktamları hidrolize edebilirler (Livermore 1995).

1.5.2.1.3 Ambler Sınıf B

Bu grupta karbapenemleri hidrolize edebilen metallo-enzimler yer alır. Bu enzimler sıklıkla *P. aeruginosa*, *Bacteroides fragilis* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'da bulunur (Burn-Buisson ve ark., 1987).

1.5.2.1.4 Ambler Sınıf D

Grup D beta-laktamazlar klavulanik asitin inhibe edemediği penisilinazları içerir. Bu enzimlerin dördü, karbenisilin ve kloksasilini yüksek oranda hidroliz eder. Bazıları metal iyonu tutulumu ile ilgili olağan dışı davranış sergilemektedir. Bu enzimlerin başka bir moleküler beta-laktamaz sınıfı olup olmadığı bilinmemektedir (Livermore 1995).

Bush ve ark. (1995) yapmış oldukları sınıflandırmada beta-laktamazları; penisilin, karbenisilin, oksasilin, sefaloridin, geniş spektrumlu sefalosporinler ve imipeneme karşı hidrolitik çeşitliliğini ve klavulanik aside duyarlılıklarını temel alarak dört grupta toplamış olup enzimlerin fonksiyonel özelliklerine, kullanılan substrat ve inhibitörlere göre gruplandırılmıştır.

1.5.2.2 Fonksiyonel sınıflandırma (Bush Sınıflandırması)

1.5.2.2.1 Grup 1 beta-laktamazlar

Enterobacteriaceae ailesi ve diğer birkaç bakteride bulunan, kromozomlar tarafından kodlanan, moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır. Sefoksitin ve sefaleksiner de dahil olmak üzere sefalosporinler üzerinde benzilpenisilinlere göre daha aktiftirler ve genellikle klavulanik asit ile inhibisyona karşı dirençlidirler. CMY, ACT, DHA, FOX, MIR ve diğer plazmid aracılı grup 1 enzimleri bu grupta bulunmaktadır (Matthew 1979).

1.5.2.2.2 Grup 2 beta-laktamazlar

Moleküler sınıflamada A ve D'de yer alan bu grup, serin beta-laktamazlardır. Grup 2a penisilinazlar, nispeten sınırlı bir hidrolitik aktivite spektrumu olan küçük bir beta-laktamaz grubunu temsil eder. Stafilokoklar ve enterokoklar dahil olmak üzere Gram pozitif koklarda baskın beta-laktamazlardır (Richmond ve Sykes 1973).

Grup 2b beta-laktamazlar, penisilinler ile sefaloridin ve sefalotin gibi sefalosporinleri kolayca hidrolize ederler. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilirler. Grup 2b beta-laktamazlar, Plazmid aracılı beta-

laktamaz olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerini içerirler (Roy ve ark., 1983). *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygındırlar (Medeiros 2000).

Grup 2be beta-laktamazlar, bu geniş spektrumlu enzimler, alt grup 2b'nin penisilinler ve sefalosporinlere karşı etki spektrumuna sahiptir ve ek olarak sefotaksim, seftazidim, aztreonam gibi oksimino-p-laktamları hidrolize eder. Klavulanik asit, sefoksitin ve sefotetana duyarlıdırlar (Bush2004). Grup 2be beta-laktamazlar, *E. coli* ve *K.pneumoniae*'da bulunurlar (Medeiros 2000).

Grup 2br beta-laktamazlar, klavulanik asit inhibisyonuna nispeten dirençli genişletilmiş bir spektrumu bir araya getiren TEM enzimlerini içerir (Richmond ve Sykes 1973).

Grup 2c beta-laktamazlar, karbenisilin veya tikarsilini hidrolize ederler. Bu penisilinazlar genellikle klavulanik asit ve tazobaktam tarafından kolayca inhibe edilir (Bush ve ark., 1995).

Grup 2d beta-laktamazlar, olarak bilinen, %50'lik bir oranda kloksasilin ve oksasilin hidrolize etme yeteneğine sahip olan OXA enzimleri bu gruptadır. OXA enzimleri tarafından karbenisilin de kolaylıkla hidroliz edilebilir. Grup 2d moleküler olarak Sınıf A'da yer alır. Bu gruptaki birçok beta-laktamaz sodyum klorür tarafından inhibe edilir (Livermore ve Williams 1996).

Grup 2e beta-laktamazlar, genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilen enzimleri içerir (Bush1989).

Grup 2f beta-laktamazlar, moleküler sınıf A içerisinde yer alan serin-karbapenemazlardır. Karbapenemleri hidrolize edebilen bu grup, klavulanik asitle inhibe edilseler de, tazobaktam tarafından daha güçlü bir şekilde inhibe edilirler (Queenan ve Bush. 2007).

1.5.2.2.3 Grup 3 beta-laktamazlar

Hem yapısal hem de fonksiyonel olarak farklı bir beta-laktamaz grubu olan metallo-beta-laktamazlar (MBL), genellikle klinik izolatlarda ve diğer beta-laktamazlarla birlikte üretilir. Kofaktör olarak çinko iyonuna sahip olmaları diğer beta-laktamazlardan farklı olan yönleridir (Rasmussen ve Bush 1997). MBL'ler

monobaktamlar için zayıf afiniteye veya hidrolitik kapasiteye sahiptir. Dolayısıyla klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilmezler. Bunun yerine, EDTA, dipikolinik asit veya 1,10-o-fenantrolin gibi metal iyonu şelatlayıcıları tarafından inhibe edilirler. Bu metalloenzimler, yapısal (alt sınıflar B1, B2 ve B3) ve fonksiyonel (alt gruplar 3a, 3b ve 3c) alt gruplara ayrılmıştır (Livermore ve Williams1996).

1.5.2.2.4 Grup 4 beta-laktamazlar

Bu grup moleküler olarak sınıflandırılmayan enzimleri içerir. Klavulanik asitle inhibe olmazlar. *Burkholderia cepacia*'daki beta-laktamazlar bu gruba dahildir.

1.5.3 Karbapenemazlar

Karbapenemazlar, çok yönlü hidrolitik kapasiteleri olan beta-laktamazlardır. Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemleri hidrolize etme yetenekleri vardır. Bu beta-laktamazları üreten bakteriler, karbapenemaz aktivitesinin pek çok beta-laktamı etkisiz kıldığı ciddi enfeksiyonlara neden olabilir. Karbapenemazlar, Ambler'in moleküler sınıflandırmasının A, B ve D grubu üyeleridir. Sınıf A ve D enzimleri serin tabanlı bir hidrolitik mekanizmaya sahiptir, B sınıfı enzimler ise aktif bölgede çinko içeren metalo-beta-laktamazlardır. A sınıfı karbapenemaz grubu, IMP, NMC, GES ve KPC ailelerinin üyelerini içerir. Bunlardan en yaygın olanı KPC karbapenemazlar, çoğunlukla *Klebsiella pneumoniae* türündeki plazmidlerde bulunur. D sınıfı karbapenemazlar, *A. baumannii*'de sıklıkla saptanan OXA-tipi beta-laktamazlardan oluşur. Metallo-beta-laktamazlar, IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM familyalarına aittir ve esas olarak *P. aeruginosa*'da tespit edilmiştir. Bununla birlikte, *Enterobacteriaceae* ailesinde görülen karbapenemazların dünya çapında arttığı pek çok araştırmacı tarafından rapor edilmektedir (Nordmann ve ark., 2011; Queenan ve Bush 2007).

1.5.3.1 Sınıf A Karbapenemazlar

A sınıfı karbapenemazlar, karbapenemleri etkili bir şekilde hidrolize eder. Bu tip karbapenemazlar çeşitli sınıflandırmaya tabi tutulmuştur. Kromozomlar tarafından kodlananlar; NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1 dir. Diğerleri ise plazmid tarafından kodlanır. Bunlar; *K.pneumoniae* karbapenemazlar (KPC), IMI-2, GES, türevlerdir. Bahsi geçen enzimler klavulanik asit tarafından kısmen inhibe edilir (Gülay 2001).

KPC'ler bu grupta klinik olarak en sık görülen enzimlerdir. İlk KPC (KPC-2, *K.pneumoniae*) 1996 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde tanımlanmıştır. KPC çoğunlukla nozokomiyal *K.pneumoniae* izolatlarında, daha az ölçüde *E. coli*'de ve diğer *Enterobacteriaceae* türlerden bildirilmiştir. KPC üreten mikroorganizmaların karbapenem duyarlılıkları belirgin şekilde değişebilir (Medeiros ve Hare 1986).

KPC üreten mikroorganizmalar genellikle birçok ilaca dirençlidir (özellikle tüm beta-laktamlara). Dolayısıyla KPC ile ilişkili enfeksiyonları tedavi etmek için tedavi seçenekleri sınırlıdır. KPC üreticileri ile oluşan enfeksiyonlar sonucu meydana gelen ölüm oranları yüksektir (>%50) (Ambler ve ark., 1991).

1.5.3.2 Sınıf B Metalloenzimler

Bu karbapenemaz sınıfı, karbapenemleri hidrolize etme yeteneği ve beta-laktamaz inhibitörlerine karşı direnci ve metal iyonu şelatlayıcıları tarafından inhibisyona yatkınlık özelliği ile karakterizedir. Substrat spektrumları oldukça geniştir; diğer karbapenemlere ek olarak, bu enzimlerin çoğu sefalosporinleri ve penisillere hidrolize eder, ancak aztreonamı hidrolize etme yeteneğinden yoksundur. Hidroliz mekanizması, enzimin aktif bölgesinde beta-laktamların çinko iyonları ile etkileşime bağlı olup, bunların EDTA, Zn^{2+} ve diğer iki değerlikli kationların bir şelatörü tarafından inhibisyonunun ayırt edici özelliği ile sonuçlanır (Walsh2005).

Tespit edilen ve çalışılan ilk metallo-beta-laktamazlar, *Bacillus cereus*, *Aeromonas spp.* ve *S. maltophilia* gibi fırsatçı patojenik bakterilerde bulunan kromozomal enzimlerdir. Bu enzimler genellikle serin beta-laktamaz enzimine sahip ve beta-laktamlara maruz kaldıktan sonra beta-laktam antibiyotiklerle indüklenen bakterilerde bulunur (Walsh 2005).

Saflaştırılmış proteinlerin fonksiyonel analizlerine dayanan erken sınıflandırma, bu beta-laktamazların, serin tabanlı bir hidrolitik mekanizmaya sahip olan enzim gruplarından ayırt edici olduğunu göstermiştir. Başlıca ayırt edici özellikleri, Zn^{2+} iyonuna gereksinimleri ve klavulanik asit ile tazobaktam tarafından inhibe edilebilmeleridir (Matthew 1975).

Varlığı doğrudan türlerin prevalansı ile korele olan kromozomal metalo-beta-laktamazların aksine, bu metalloenzimlerin edinilmiş veya nakledilebilen ailelerinin saptanmasında ve yayılmasında önemli bir artış olmuştur. En yaygın metallo-beta-

laktamaz aileleri, gen kasetleri olarak dahil edildiği çeşitli integron yapıları içinde yer alan VIM, IMP, GIM ve SIM enzimlerini içerir. Bu integronlar plazmidler veya transpozonlar aracılığıyla bakteriler arasında kolayca transfer edilebilir (Libisch ve ark., 2006).

1.5.3.3 Sınıf D Karbapenemazlar

OXA (oksalilini hidrolize eden karbapenemaz) beta-laktamazlar, 1970'lerin sonlarında ve 1980'lerin başında en yaygın plasmidle kodlanmış beta-laktamaz ailelerden birini temsil eder (Naas ve Nordmann 1999).

Moleküler sınıf D OXA beta-laktamazlar, diğer serin beta-laktamazlardan ayrı bir moleküler sınıfta yerleştirildiklerinde, esas olarak *Enterobacteriaceae* ve *P. aeruginosa*'da tanımlanmışlardır ve işlevsel olarak oksasilin ve koloksasilini hidrolize edebilen penisilinazlar olarak tanımlanmıştır (Medeiros1997).

Genel olarak klavulanik asit ve EDTA tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilmişlerdir ve amino asit sekanslarında büyük miktarda değişkenliğe sahip oldukları bilinmektedir. Şu anda 9 tane genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz olan ve en az 37 tanesi karbapenemaz olduğu düşünülen 102 farklı OXA sekansı olmuştur. OXA beta-laktamazların katalitik mekanizması diğer serin karbapenemazlarla birlikte özellikleri paylaşır (Walther-Rasmussen ve Hoiby2006).

OXA enzimlerinin düşük verim nedeniyle saflaştırılması zordur ve bazı substratlar için düşük hidroliz oranları ve bifazik kinetikleri nedeniyle biyokimyasal olarak karakterize etmek zordur. Biyokimyasal olarak karakterize edilen OXA karbapenemazlar, penisilinlere, bazı sefalosporinlere ve imipeneme karşı ölçülebilir hidrolitik aktiviteye sahiptir (Heritier ve ark., 2005).

Genel olarak, meropenem hidrolizinden daha hızlı olan imipenem hidrolizi, sırasıyla 1s-1 ve 2s-1'de 6 OXA-54 ve OXA-48 enzimleri için en yüksek kcat değerleri ile yavaştır. İmipenem için Km değerleri de düşüktür, 2 ila 20 µM arasında değişir, bu da OXA enzimlerinin bu substratlar için çok yüksek afiniteye sahip olduğunu gösterir. Aksine, genişlemiş spektrumlu sefalosporinler OXA karbapenemazlar tarafından ölçülebilir bir şekilde hidrolize edilmez veya çok zayıf hidrolizlenir (Turner 2004).

1.5.3.4 Karbapenemaz Varlığını Doğrulama Yöntemleri

Cevap alınamayan karbapenem tedavisinde karbapenemaz üretiminin saptanması kritik bir aşamadır. Dolayısıyla hastane infeksiyonlarının engellenmesi açısından önemlidir. Karbapenemaz saptanmasından kullanılan yöntemler fenotipik ve genotipik olmak üzere iki grupta sınıflandırılmaktadır (Livermore 2001).

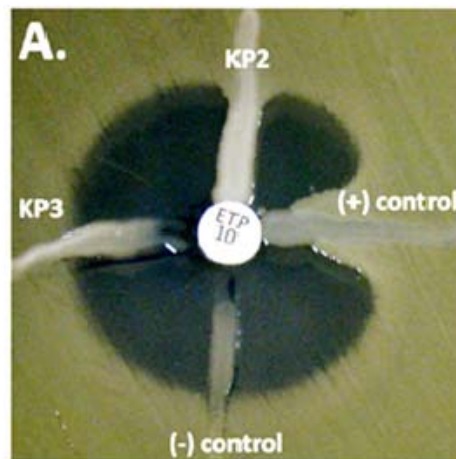
1.5.3.4.1 Fenotipik Yöntemler

Karbapenemazların saptanması için, karbapenemlere duyarlılıkta azalma saptandığında rutin duyarlılık testlerinde fenotipik yöntemler uygulanmalıdır (<http://klimud.org/public/uploads/files/EUCAST%20%C3%B6zel%20diren%C3%A7%20mekanizmalar%C4%B1.docx> 04 Nisan 2018).

1.5.3.4.2 Modifiye Hodge gradiyent testi (MHT)

İlk olarak *N. gonorrhoeae*'de penisilnaz aktivitesinin gösterilmesinde MHT kullanılmış, daha sonraki yıllarda MBL tespit etmek için Lee ve ark. (2003) tarafından geliştirilmiştir. Test için gerekli olan malzemeler imipenem duyarlı *E. coli* ATCC standart suşu, imipenem diski, test edilecek bakteri ve Müller Hinton agardır.

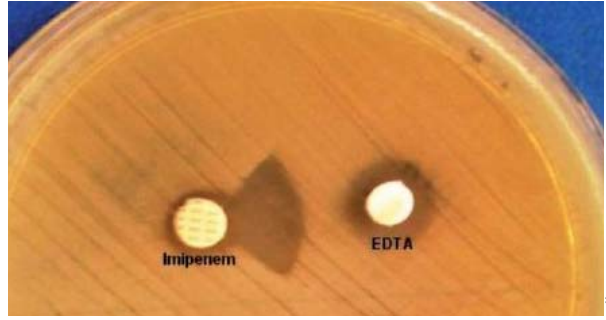
İmipenem diskinin kenarından başlayarak dışa doğru ışınal bir şekilde imipenem dirençli suşun ve kontrol suşlarının pasajı yapılır. Bir gecelik inkübasyondan sonra, inhibisyon zonunda yonca yaprağı şeklinde görüntünün olması halinde MBL pozitif olarak kabul edilir (Wayne 2011).



Şekil 1. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan Modifiye Hodge gradiyent testi (Petersen-Morfin ve ark., 2017).

1.5.3.4.3 Çift Disk Sinerji Testi

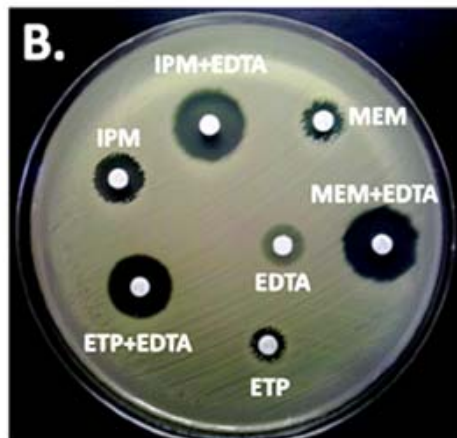
İmipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tespit edilmesiyle MBL pozitif bakterilerin tanımlanması esasına dayanır. İmipenem diskinin merkezinden 10 mm uzağına yerleştirilmiş boş disk üzerine EDTA eklenir. EDTA eklenmiş diske doğru imipenem diski inhibisyon zonunun genişlemesi, sinerjist inhibisyon zonu olarak değerlendirilir (Kaçmaz ve Ece 2010).



Şekil 2. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan çift disk sinerji testi.
*(http://www.ijmm.org/viewimage.asp?img=IndianJMedMicrobiol_2008_26_3_233_39587_2.jpg)

1.5.3.4.4 Kombine disk diffüzyon testi

Plak içerisine 2 imipenem diski yerleştirilir ve bunlardan bir tanesine EDTA eklendikten sonra inkübasyona bırakılır. Sonrasında inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirmenin yapılır. EDTA solüsyonu eklenen imipenem diskinin inhibisyon zonu, imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm büyük ise MBL pozitif olarak kabul edilmektedir (Lee ve ark., 2003).



Şekil 3. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan kombine disk diffüzyon testi (Petersen-Morfin ve ark., 2017).

1.5.3.4.5 Gradyent test yöntemi

Gradyent test (E test), dilüsyon ve diffüzyon testlerinin kombinasyonundan ibarettir. Gradyent test şeritlerinin diğer yüzünde ise, belirlenen antibiyotik konsantrasyonları ile kaplı yüzey bulunmaktadır. Bu şeritler inoküle edilmiş agar plağı üzerine yerleştirildiğinde ilk 5 saniyede gradientin %90'ı, 30 dakikada ise, %100'ü agar matrisine geçer. İnkübasyon sonunda bakteriyel üreme görünür hale geldikten sonra şerit merkezli simetrik inhibisyon zonu oluşur. Minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değeri elipsin şerit ile kesiştiği noktadan $\mu\text{g/mL}$ cinsinden okunur. Gradyent test ile kantitatif ölçüm yapılır. Artan konsantrasyonlarda antibiyotik içeren özel hazırlanmış plastik şeritler kullanılır. Ekim yapıldıktan sonra 35°C de 18-20 saat inkübasyon yapılır. Plak üzerinde elips şeklinde oluşan inhibisyon alanının stripi kestiği nokta MİK değerini verir (Livermore 2001).



Şekil 4. Karbapenemaz varlığının doğrulanmasında kullanılan gradyent test yöntemi.

* (<https://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/654939/fig1/>)

1.5.3.4.6 Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/ İyonizasyonu-Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI TOF MS)

Bu yöntemde, mikroorganizmaların içerdiği biyomoleküllerin (protein, peptid, şeker) ve büyük organik moleküllerin (polimer, dendrimer, makromolekül) iyonize edilmesinden sonra elektrik ve/veya manyetik alandan geçirilmesi ile protein görünümleri çıkarılmaktadır. Bu protein görünümlerine ait grafiksel görüntüler elde edilmekte ve sistemin veri tabanındaki referans mikroorganizmaya benzerliğine göre mikroorganizmalar cins ve tür olarak tanımlanabilmektedir (Fenselau ve Demirev, 2001). Mikrobiyoloji alanında moleküler yöntemlerin kullanımı ile birlikte bu alanda birçok ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu ilerlemelerin önemli ürünlerinden biri olarak son yıllarda mikrobiyolojik materyallerin incelenmesinde matris aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi “matrix-assisted laser

desorbition/ionization time-of flight mass spectrometry” (MALDI-TOF MS) kullanılmaya başlanmıştır (Doğan 2018).

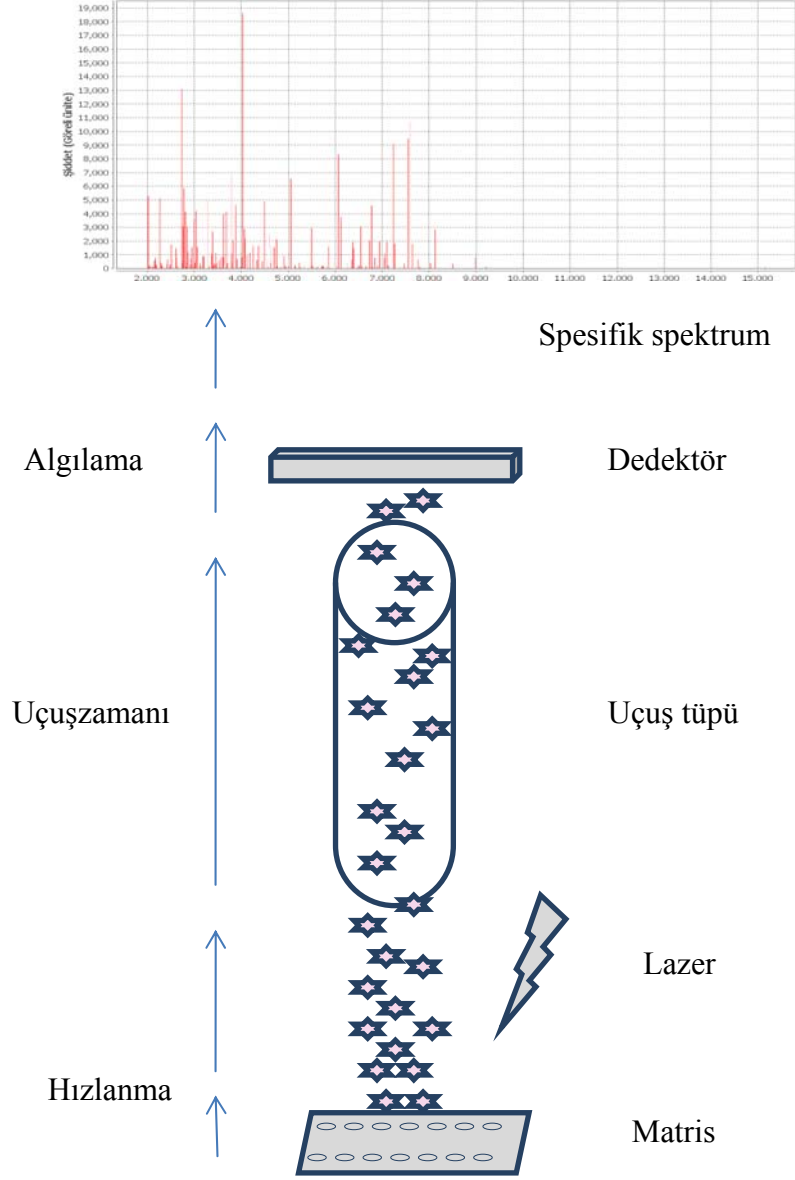
MALDI-TOF MS sistemi 1980 yıllarının sonlarına doğru mikrobiyal proteomiklerin saptanmasında kullanılmıştır. 1990’lı yılların başlarında, çeşitli çalışmalar sonucunda, iyonizasyon tekniklerinin (MALDI ya da elektro spray iyonizasyon (ESI)) sisteme entegre olması ile protein gibi büyük moleküllerin incelenmesi imkanlarına kavuşulmuştur. 1990’ların ortalarına doğru bakteriyolojik tanımlamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Ardından, bakteri tanımlama için ilk veri tabanı 2004 yılında bildirilmiştir. MALDI-TOF MS, kütle spektrometresine dayalı, organizmaların özgül proteinlerden o mikroorganizma için özgül proteomik kalıplarının tanımlandığı piklerin karşılaştırılması esasına dayalı bir sistemdir (Emonet ve ark., 2010; Cobo 2013).

Ayrıca tıp alanında MALDI-TOF MS’in kullanımı mikrobiyoloji ile sınırlı değildir. Günümüzde bakteriyoloji, viroloji, mantarlar ve diğer hastalık etkenleri ile ilgili birçok araştırma MALDI-TOF MS sistemi ile başarılı bir şekilde yapılabilmektedir. Günümüz konvansiyonel ve moleküler tanımlama yöntemlerine bir alternatif olarak, hızlı tanımlama yapabilmesi ile MALDI-TOF karşımıza çıkmaktadır. Bu sistem araştırma ve gelişmelere açık olup konvansiyonel metotlarla veya PCR gibi genetik materyal üzerinden çalışan metotlarla yapılan testler için de umut oluşturmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin tanımlanmasında yüksek duyarlılığa sahip olup mikobakteri ve mayalarla ilgili tanımlama çalışmalarda kabul edilebilir sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca filamentöz mantarlar ve dermatofitlerin tanısında başarılı sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır ancak sistemin geliştirilmesine ve tecrübelerin artırılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sistemler aşı çalışmalarında da protein yapıların incelenmesine katkı sunabilmektedir (Štveráková ve ark., 2018, Doğan 2018).

MALDI-TOF MS cihazı temel olarak üç bölümden oluşmaktadır (Angeletti 2017, Doğan 2018):

- 1. İyonizasyon kaynağı:** MALDI soft iyonizasyon kaynağıdır.
- 2. Kütle analizörü:** Lazer desorbisyon sistemleri farklı kütle analizörleri ile birleştirilebilir. Kütle spektrometresi olarak, genellikle MALDI ile birlikte TOF (time of flight) kullanılır.

3. Algılama bölümü: İyonların kütlesi yüküne (m/z) oranlanır ve karekökü alınır. Buna bağlı bir analiz yapılır, biyomoleküller yoğunluk ve bu orana göre sınıflandırılır.



Şekil 5. MALDI TOF MS çalışma prensibi (Doğan 2018).

MS tekniğinde incelenecek örnek metal bir plak üzerine damlatılır ve üzerine bir matris solüsyonu konarak havada kurutulur. Bu teknikte numuneler, birkaç biyomolekülün karıştırılmasıyla hazırlanır ve içeride kristalleşecek bir matrise gömülür. Protein biyomarkırların belirlenmesi için 2,5-dihidroksibenzoik asit, sinapnik asit, ferulik asit ve α -siyano-4-hidroksisiamik asitler önerilmektedir. Elde

edilen piklerin yoğunluğu, kullanılan matriks türüne göre değişiklik göstermektedir. α -siyano-4-hidroksisünamik ve 2,5-dihidroksibenzoik asit genellikle 10kDa'dan daha küçük kütleler için, ferulik asit ve sinapinik asit de 15kDa'dan daha yüksek kütlelerin tespitinde daha uygun asit formlarıdır. Matris, kompozisyonu kullanılan lazer türüne ve analiz edilecek biyomoleküle göre farklılık gösterse de, kullanılan lazer dalga boyu aralığında, güçlü bir optik absorpsiyona sahip küçük asit moleküllerinden oluşmaktadır. Daha sonra moleküller, kısa bir lazer darbesinin enerjisini absorbe ederek yük transferiyle hem ayrıştırılır hem de iyonlaştırılırlar. Ayrışan ve iyonize olmuş moleküller ilk önce bir elektrik alanıyla hızlandırılır ve metal bir uçuş tüpü vasıtasıyla atılır ve uçuş tüpünün ucundaki bir detektörle çarpışır. Bu döngü, 50 veya daha fazla hertz frekansında tekrarlanır. Böylece biyomoleküller kütlelerine göre ayrılır ve iyonların hem kütlesi hem de yoğunluğu ile karakterize edilen bir kütle spektrumu oluştururlar. Sonuç olarak, ürün, mikroorganizmanın tanımlanması için uygun veritabanında, üretici tarafından sağlanan verilerin karşılaştırıldığı sivri pik dalga tekrarlarından oluşan hayali bir işaretten ibarettir. MALDI-TOF MS tekniklerinin prensibi kabaca Şekil 5'de gösterilmiştir (Angeletti 2017; Praveen ve ark., 2016; Doğan 2018).

1.5.3.5 Genotipik Yöntemler

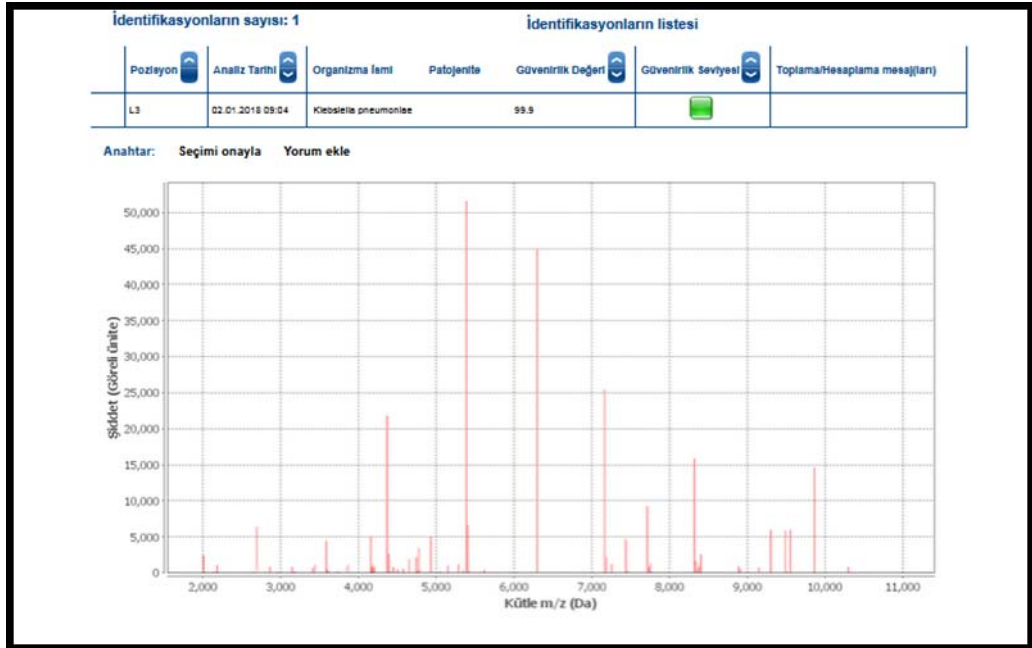
Geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve modifiye PZR yöntemlerinden, GSBL taşıyan bakterilerin tespitinde ve tiplendirilmesinde yararlanılabilir. GSBL kodlayan genlerde mutasyonların çok çeşitli olması sebebiyle dizi analizi ve Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) gibi daha ileri düzey yöntemlerde kullanılabilir (Babalola 2003). BD MAX™ CRE Assay gibi, karbapenem dirençli izolatlarda sıklıkla rastlanan karbapenemaz genlerini gerçek zamanlı PZR yöntemiyle belirleyen hazır kitler, karbapenemaz tespitinde kullanılan diğer genotipik yöntemlerdir (Knabl ve ark., 2016).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereç

2.1.1 Kullanılan Bakteriler

Çalışma için Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gelen kan örneklerden daha önce izole edilmiş ve tanımlanmış karbapenem-duyarlı olan ve olmayan, karbapenemaz direnç genleri daha önce moleküler yöntemle belirlenmiş 96 *K. pneumoniae* izolatu ile imipenem ve meropenem dirençli olmayan 40 *K. pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edildi. Bakterilerin tanımlanması için otomatize identifikasyon sistemi olan VITEK® MS MALDI TOF (BioMeerieux, Fransa) kullanıldı. Bakterilerin vermiş olduğu spesifik pikler sistemin veri bankasında değerlendirildikten sonra %98 güvenliğinin üzerinde *K. pneumoniae* olarak bildirilen suşlar çalışmaya alındı (Şekil 6). Daha düşük güvenlikte alınan sonuçlar çalışmaya alınmadı. Tüm bakteriler %15 gliserin içeren stok besiyeri içerisinde -20 °C de stoklandı.



Şekil 6. MALDI TOF MS ile tanımlanmış bakterinin göstermiş olduğu pikler.

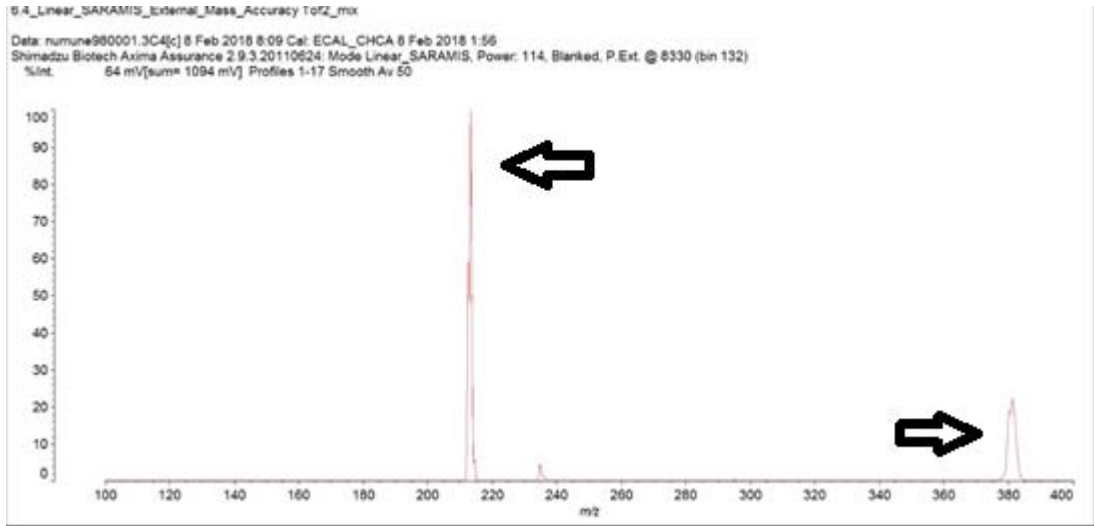
2.1.2 İnokülasyonun Hazırlanması

Stok besiyerlerinden alınan örnekler oda ısısına getirildikten sonra kanlı agara ekildi ve bir gece 35 °C de inkübe edildi. Üreyen taze kültürlerden deney için

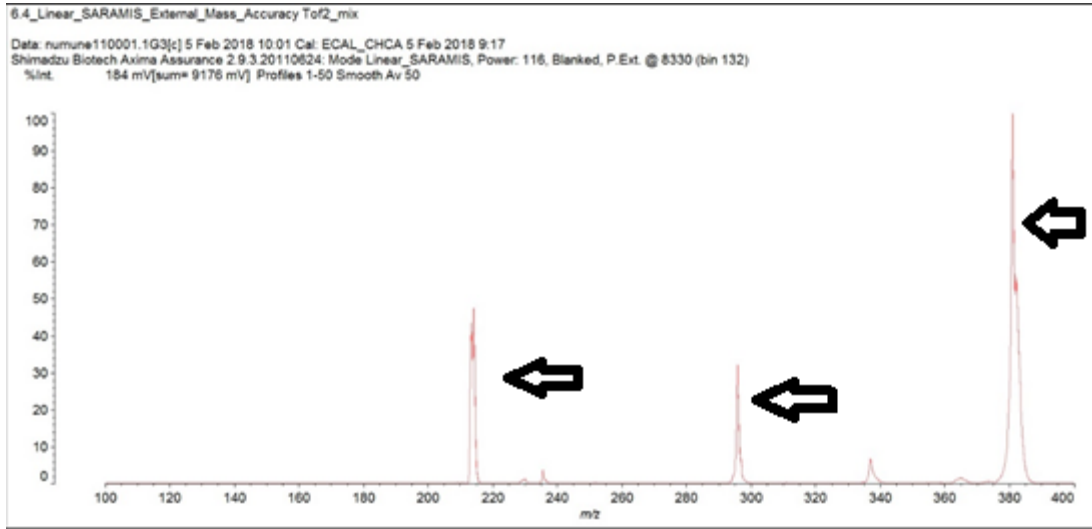
süspansiyonlar hazırlandı. Bunun için 100 adet deney tüpü için 150 mM NaCl ve 20 mM TRIS HCl içerecek şekilde çözelti hazırlandı. Bu çözeltilerden 3'er ml deney tüplerine aktarıldı. İnkübasyon sonrası üremiş olan bakterilerden öze ile alınarak 4 McFarland yoğunlukta olacak şekilde ayarlandı. Hazırlanan 3 ml'lik bu süspansiyonlardan 1'er ml alınarak mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı. Mikrosantrifüj tüpleri 3 dk. 14.000 *rpm*'de santrifüje tabi tutuldu. Santrifüj işleminden sonra süpernatantlar atıldı, peletler içine 50'şer µl 150 mM NaCl, 20 mM TRIS HCl ve 20 mM meropenem içeren çözeltilerden ilave edildi ve pipetaj yapıldı. Bu bileşim, 35 ° C'de 3 saat inkübe edildi. Ardından, ilgili bileşim 3 dk. 14.000 *rpm*'de santrifüje tabi tutuldu ve süpernatanttan 1 µl alınarak preparat hazırlandı. MALDI-TOF VITEK® MS MALDI TOF (BioMeerieux, Fransa) kütle spektrometresinde değerlendirmeler yapıldı.

2.1.3 MALDI-TOF Kütle Spektrometresi

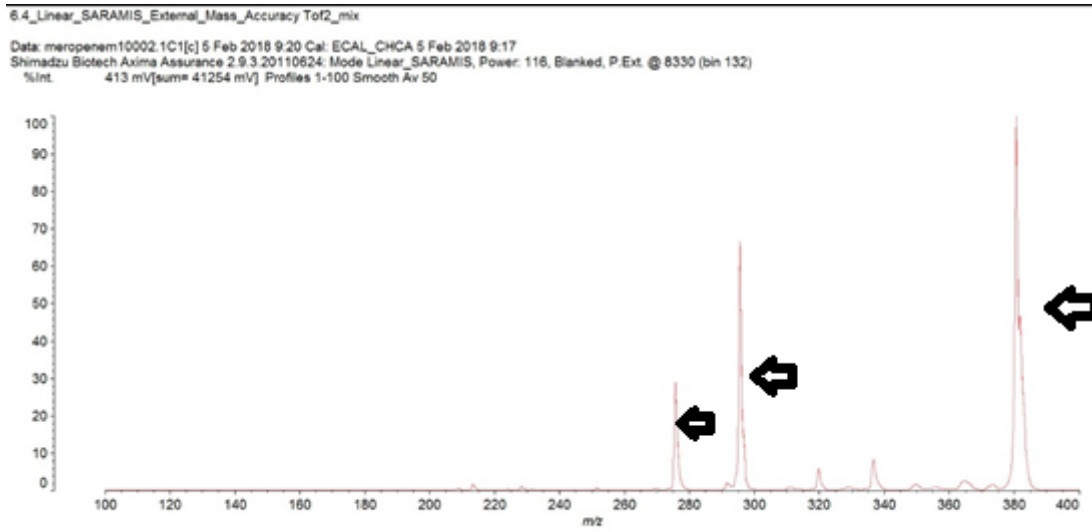
Süpernatanttan hazırlanan numune VITEK® MS MALDI TOF (BioMeerieux, Fransa) cihazı ile analiz edildi. Karbapenem dirençli izolatın vermiş olduğu MALDI TOF MS pik diyagramı örneği Şekil 7'de, karbapenem duyarlı izolat örneği Şekil 8'de ve negatif kontrolün (sadece meropenem) pik diyagramı Şekil 9'da verilmiştir.



Şekil 7. MALDI TOF MS diyagramı: Karbapenem dirençli izolata örnek.



Şekil 8. MALDI TOF MS diyagramı: Karbapenem duyarlı izolata örnek.



Şekil 9. Negatif kontrolün (sadece meropenem) MALDI TOF MS diyagramı.

3. BULGULAR

Çalışmaya alınan karbapenem dirençli izolatların genotipik tiplendirmesinde olarak 93'ünün OXA-48 genine, 3'ünün NDM genine sahip idi. Genotipik direnç genleri belirlenmiş toplam 96 izolatın MALDI-TOF MS analizlerinde 88'inin karbapeneme dirençli olduğu gözlenmiş, 3'ünün ise dirençli olduğu tespit edilememiş duyarlı gibi değerlendirilmiştir. 5 izolat için dirençli veya duyarlı yorumu yapılamamıştır. Bu yöntemin karbapenem direncini belirlemede %96,7 duyarlılığa sahip olduğu, özgüllüğünün %100 olduğu, Pozitif Prediktif Değer (PPD)'in %100 olduğu ve Negatif Prediktif Değer (NPD)'in %93 olduğu belirlenmiştir. Beş izolat için herhangi bir yorum yapılamaması testin verimliliğini düşürmektedir.

4. TARTIŞMA

Karbapenemaz sentezleyen *Enterobacteriaceae* üyelerinin düşük seviyelerdeki karbapenem direncine sahip olması sıklıkla gözlemlenen bir fenomendir ve karbapenemlerin MİK değerleriyle ilgili yanıltıcı sonuçlara neden olabildiği için karbapenemaz tespitini zorlaştıran bir durumdur. Düşük düzeyde karbapenemaz sentezleyen enfeksiyon etkenlerinin tespiti uluslararası kılavuzların belirlediği sınır değerlere göre her zaman mümkün olamamaktadır. Özellikle OXA-48 sentezleyen kökenler genellikle düşük seviyede karbapenemaz üreticileridir ve karbapenemlere dirençli kökenler içerisinde OXA-48 tespitinde kullanılabilecek tek başına tanı değeri yüksek olan fenotipik bir yöntem mevcut değildir (Birgy ve ark., 2012). Dolayısıyla, karbapenemaz sentezleyen kökenleri spesifik olarak belirlemek için tek bir karbapenem tarama kriterinin kullanılmayacağı rasyonel olarak öngörülebilir. Bu nedenle, doğrulayıcı testlerin kullanılması özellikle karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae'nin* saptanması için gereklidir (Sakanashi ve ark. 2017; Birgy ve ark., 2012). Bu durum iş yükünün artması, ekonomik kayıp ve en önemlisi tespit süresinin uzun olması gibi problemleri beraberinde getirmektedir.

Günümüzde beta-laktamazların ve karbapenemazların tespitinde kullanılan konvansiyonel yöntemlerin duyarlılıkları genel olarak yüksektir. Örneğin, *Enterobacteriaceae* türlerinde karbapenemaz tespitinde MHT yöntemini kullanan Miriagou ve ark. (2010), testin %95-100 duyarlılığa sahip olduğunu gözlemlemiştir. Ribeiro ve ark. (2014) β -laktamazların varlığında elde edilen zor yorumlama ve yaygın yanlış pozitif sonuçlarla ilgili kaygılardan yola çıkarak yaptıkları çalışmada MHT'nin nicel bir yorumunun performansını değerlendirmeyi amaçlamıştır. Çalışma sonunda testin duyarlılığının % 99,4 olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Legese ve ark. (2017) çocuk hastalarda enfeksiyona neden olan *Enterobacteriaceae* üyeleriyle yaptıkları çalışmada beta-laktamaz ve karbapenemaz tespitinde kullandıkları çift disk sinerji testinin %90,9 duyarlılığa sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Pesteran ve ark. (2009) diğer fenotipik bir yöntem olan kombine disk sinerji testini kullandıkları çalışmada çeşitli karbapenemaz üreticilerinin tespitinde %86-100 duyarlılıkta sonuç almışlardır. Bu ve benzeri örneklere karşın, MALDI TOF MS karbapenemaz tespitinde benzer duyarlılıkta işlevselliğe sahip olmasının

yanı sıra, konvasiyonel yöntemlerle sınırlı şekilde yapılabilen karbapenamaz ayırımına da olanak sağlamaktadır.

Beta-laktamaz / karbapenamaz tespitinde duyarlılık yüzdeleri yüksek olan konvasiyonel yöntemlerin en önemli dezavantajı inkübasyon süresinin uzun olmasıdır. Buna karşılık MALDI TOF MS gibi otomatize sistemlerle, kısa süre içerisinde aynı düzeyde yüksek duyarlılık yüzdelerine sahip sonuçlar alınabilmektedir. Ayrıca doğrudan hasta numunesinden identifikasyona olanak sağlamasının yanı sıra, antibiyogram tespiti ve enzim düzeyinde ayırım yapılabilmektedir (Espinosa ve ark., 2018).

MALDI-TOF MS, çeşitli enfeksiyon etkenlerinin identifikasyonunda ve araştırma laboratuvarlarındaki rutin çalışmalarında giderek artan sıklıkla kullanılan otomatize bir yöntemdir. Numunenin lazer ile iyonizasyonu ve açığa çıkan moleküllerin farklı uçuş davranışlarının analizi prensibine dayanan yöntem, enfeksiyon etkeninin karbapenamaz sentezlemesi durumunda karbapenemlerin hidrolitik ürünlerinin tespit edilmesi aracılığıyla kısa sürede karbapenamaz üretimini saptayabilmektedir. Duyarlılık ve özgüllüğün genellikle yüksek olması, analiz süresinin kısa olması, kan ve dolaşım sistemi enfeksiyonları gibi önemli enfeksiyonlarda direk olarak numuneden direnç analizi yapılabilmesi gibi yöntemin pek çok avantajlı yönü vardır (Angeletti 2017; Kılıç ve ark., 2016).

Ekstraksiyonda kullanılan solüsyonlar, analizde kullanılacak olan antibiyotik ve inkübasyon süreleri ile ilgili çalışmalar çeşitlendirilerek MALDI TOF MS yönteminin optimize edilmesi, laboratuvar tanısında ve özellikle karbapenamaz tespitinde önemli dönüm noktalarından biri olacaktır. Böylelikle yöntem daha yaygın bir kullanım alanına sahip olabilecektir (Praveen ve ark. 2016; Ikryannikova ve ark., 2008).

Bu konuda, MALDI TOF MS yöntemi kullanılarak yapılan çalışmada, MALDI-TOF MS yöntemi, karbapenamaz aracılı karbapenem direnci taşıyan *Enterobacteriaceae* üyeleri ve *P. aeruginosa*'da doğrulanmıştır. Çalışmaya alınan 124 suşun 30'unun karbapenamaz ürettiği geleneksel yöntemlerle ortaya konulmuştur. MALDI-TOF MS ile suşların direnç durumu araştırıldığında, yöntemin duyarlılığı %96,67, özgüllüğü ise %97,87 olarak tespit edilmiştir. Bulgular, bu yöntemin

Enterobacteriaceae üyeleri ve *Pseudomonas* türlerindeki karbapenemazların tespitinde rutin olarak kullanılabilceğini göstermiştir (Hrabák ve ark., 2011)

MALDI-TOF MS kullanarak karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızlı tespiti ile ilgili yapılan başka bir çalışmada, çeşitli karbapenemaz üreten ve üretmeyen toplam 105 suşu karakterize edip bu yöntemi kullanarak test etmiştir. Antibiyotiğin parçalanmasını tespit etmek için bir imipenem hidroliz analizi, ardından kütle spektrometresi uygulamıştır. Sonuç olarak, elde edilen veriler PZR ile kontrol edildiğinde, her iki test de %87 duyarlılık ve %100 özgüllük göstermiştir (Knox ve ark., 2014).

Benzer şekilde, MALDI-TOF MS kullanarak kan kültürü örneklerinden doğrudan karbapenemaz aktivitesini saptamıştır. Toplam 100 kan kültürü örneği MALDI-TOF MS ve moleküler yöntemlerle karbapenemaz yönünden analiz edilerek karşılaştırılmıştır. İzole edilen toplam 110 bakteriyel izolatın moleküler yöntemlerle 29'unun MALDI-TOF MS ile 21'inin (%72,4) karbapenemaz ürettiği tespit edilmiştir (Carvalhoes ve ark., 2014).

Başka bir çalışmada ise, ertapenem kullanarak yaptıkları MALDI-TOF MS analizinde, sadece 15 dakika inkübasyondan sonra KPC'ye sahip olan suşları tespit edebilmiştir. Bununla birlikte, VIM'e sahip olan *P. aeruginosa*'da 14 izolatın sadece 8'i (%57) doğru tespit edilmiştir (Johnson ve Woodford 2013).

Bu çalışmada, genotipik direnç genine sahip 96 izolatın MALDI-TOF MS analizlerinde, karbapenem direncini belirlemede %96,7 duyarlılığa sahip olduğu, özgüllüğünün %100 olduğu, Pozitif Prediktif Değer (PPD)'in %100 olduğu ve Negatif Prediktif Değer (NPD)'in %93 olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızda elde edilen duyarlılık verileri, yapılan diğer çalışmalarla da benzerdir. Beş izolat için herhangi bir yorum yapılamaması testin verimliliğini düşürmektedir. Bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğün yüksek olması, ayrıca analiz süresinin kısa olması nedeniyle diğer yöntemlere göre daha avantajlı olduğu gözlenmektedir. Yöntemin bu alanda yeni kullanılıyor olması ve literatürde yeterli verinin olmaması nedeni ile tam bir standardizasyon sağlanamamıştır.

Sonuç olarak, identifikasyon ve antibiyotik duyarlılık çalışmalarında kullanılmaya başlanan MALDI-TOF MS, bu alanda oldukça yeni bir uygulama olup

karbapenem direncinin belirlenmesinde duyarlılığının yüksek olduğu ve fenotipik yöntemlere göre daha hızlı sonuç alındığı gözlenmiştir. Buna karşılık, özellikle antimikrobiyal duyarlılık tespitinde, özgüllük ve duyarlılığının ortaya konması ve standardizasyonun sağlanması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

5. KAYNAKÇA

Adler A, Katz DE, Marchaim D. The continuing plague of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* infections. *Infect Dis Clin North Am*. 2016; 30(2):347-75.

Ambler RP, Coulson AFW, Frere JM, Ghuysen JM, Joris B, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem.J*. 1991;276:269-70.

Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B*. 1980; 289:321-31.

Angeletti, S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 138:20–9.

Babalola OO. Molecular techniques: An overview of methods for the detection of bacteria. *African Journal of Biotechnology*. 2003;(12),710-3.

Bagley ST. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infection control: IC*. 1985;6(2):52-8.

Bassetti M, Righi E. New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of Gram-negative bacterial infections. *Curr Opin Crit Care*. 2015;21(5):402-11.

Bassetti M, Giacobbe DR, Giamarellou H, Viscoli C, Daikos GL, Dimopoulos G et al. Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2018;24(2):133-44.

Berger SA, Pollock AA, Richmond AS. Isolation of *Klebsiella ozaenae* and *Klebsiella rhinoscleromatis* in a general hospital. *Am J Clin Pathol*. 1977, 67(5):499–502.

Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1295-302.

Boyle DP, Zembower TR. Epidemiology and management of emerging drug-resistant Gram-negative bacteria: Extended-Spectrum β -Lactamases and Beyond. *Urol Clin North Am*. 2015;42(4):493-505.

Boye K, Hansen DS. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. *Int J Med Microbiol*. 2003;292(7-8):495-503.

Botelho-Nevers E, Gouriet F, Lepidi H, Couvret A, Amphoux B, et al. Raoult D. Chronic nasal infection caused by *Klebsiella rhinoscleromatis* or *Klebsiella ozaenae*: two forgotten infectious diseases. *Int J Infect Dis*. 2007;11(5):423-9.

Broberg CA, Palacios M, Miller VL. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Rep*. 2014; 1: 6: 64.

Burn-Buisson, et al. Transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet*, 1987;11:302-6.

Bush, K. Characterization of β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1989;33:259-63.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother*. 1995;39:1211-33.

Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in. *J Antibiot*. 2013;66(10):571–591.

Carvalhoes CG, Cayô R, Visconde MF, Barone T, Frigatto EA, et al. Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(8):2132-6.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document M100-S20U. Update. 2010.

Cobo F. Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical virology: A review. *The Open Virology Journal*. 2013;7:84-90.

Çiftçi H, Karakeçe E, Aşık G, Demiray T, ER H. Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında OXA-48 ve KPC varlığının araştırılması. *Ankem Derg*. 2013;27(2):49-54.

Dana Štveráková, Ondrej Šedo, Martin Benešik, Zbyněk Zdráhal, Jiří Doškař, et al. Rapid identification of Intact Staphylococcal bacteriophages using matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry. *Viruses* 2018; 10(4):176.

De Champs C, Sirot D, Chanal C, Poupart MC, Dumas MP, Sirot J. Concomitant dissemination of three extended-spectrum beta-lactamases among different *Enterobacteriaceae* isolated in a French hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 1991;27:441–457.

Demiray T, Aydemir Ö, Kılıç Ü, Yılmaz K, Köroğlu M, et al. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemaz saptanmasında karbapenemaz inaktivasyon testinin kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2017;47(2):78-82.

Doğan M. Matriks aracılı dezorbsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) sistemlerinin virolojide kullanımı. Altındaş M(Ed). *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji*. Nobel Yayınevi, 2018;419-25.

Edwards PR, Ewing WH. Identification of *Enterobacteriaceae*. Elsevier Science Publishing. 1986, p: 144-250.

Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J. Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 1604–13.

Endimiani A, Choudhary Y, Bonomo R. In vitro activity of NXL104 in combination with β -Lactams against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing KPC carbapenemases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53; 83599-601.

Espinosa RF, Rumi V, Marchisio M, Cejas D, Radice M, et al. Fast and easy detection of CMY-2 in *Escherichia coli* by direct MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods.* 2018; 148:22-28.

EUCAST. <http://klimud.org/public/uploads/files/EUCAST%20%C3%B6zel%20diren%C3%A7%20mekanizmalar%C4%B1>.

Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem.* 2014;28(6):25–64.

Fenselau C, Demirev, P.A. Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 2001; 20: 157–71.

Giske C, Sundsfjord AS, Kahlmeter G, Woodford N, Nordmann P, et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(1): 1-4.

Ghafourian S, Sadeghifard N, Soheili S, Sekawi Z. Extended spectrum beta-lactamases: definition, classification and epidemiology. *Curr Issues Mol Biol.*2015;17:11-21.

Ghosh AS, Melquist AL, Young KD. Loss of O-antigen increases cell shape abnormalities in penicillin-binding protein mutants of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters.* 2006; 263(2):252-7.

Gupta A, Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit – *K.pneumoniae*. *Semin Perinatol.* 2002; 26(5): 340-5.

Gülay Z. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi.* 2001;5(3):210-29.

Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora Dergisi.* 1997; 2: 3-18.

Heritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3198-202.

Hoppe S, Bier FF, Von Nickisch-Roseneck M. Identification of antigenic proteins of the nosocomial pathogen *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One.* 2014; 9(10): e110703.

Hrabák J, Walková R, Studentová V, Chudácková E, Bergerová T. Carbapenemase activity detection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol.* 2011;49(9):3222-7.

<http://acikerisim.deu.edu.tr/xmlui/bitstream/handle/12345/13389/288439.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

http://www.ijmm.org/viewimage.asp?img=IndianJMedMicrobiol_2008_26_3_233_39587_2.jpg

<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2012/654939/fig1/>

Ikryannikova LN, Shitikov EA, Zhivankova DG, Il'ina EN, Edelstein MV, et al. A MALDI TOF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of *Enterobacteriaceae*. *J Microbiol Methods*. 2008;75:385–91.

Iraz M, Düzgün A, Sandallı C, Doymaz MZ. Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. 2015; 35(6): 595–601.

Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, Culver DH, Hughes JM. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection control*. 1985;6(2):68-74.

Jacoby GA, Medeiros AA, O'Brien TF, et al. Broad-spectrum, transmissible β -lactamases. *N Engl J Med* 1988; 319: 723-4.

Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J. Med. Microbiol*. 2013;62:499–513.

Kaçmaz B, Ece G. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin çift disk sinerji testinde kullanılması ve sefoksitin duyarlılığı, *ANKEM Derg*. 2010; 24(2): 61-4.

Karabay O, Altindis M, Koroglu M, Karatuna O, Aydemir ÖA, et al. The carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* threat is growing: NDM-1 epidemic at a training hospital in Turkey. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016; 15:6.

Kılıç A, Baysallar M. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. *Ann Lab Med*. 2015; 35:382-3.

Knabl L, Grutsch I, Orth-Höller D. Comparison of the BD MAX Enteric Bacterial Panel assay with conventional diagnostic procedures in diarrheal stool samples. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016;35(1):131-6.

Knox J, Jadhav S, Sevier D, Agyekum A, Whipp M, et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. *J Clin Microbiol*. 2014;52(11):4075-7.

Kılıç Ü, Demiray T, Altındış M. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *Ankem Derg*. 2016; 30(2): 62-75.

Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge gradient test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* *J Clin Microbiol*. 2003;41:4623-29.

Legese MH, Weldearegay GM, Asrat D. Extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* among Ethiopian children. *Infect Drug Resist*. 2017; 25(10): 27-34.

Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*. 2014;9(9):1071-81.

Libisch B, Muzslay M, Gacs M, Minarovits J, Knausz M, et al. Molecular epidemiology of VIM-4 metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas sp.* isolates in Hungary. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50:4220-23.

Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995; 8: 557-84.

Livermore DM, Williams DJ. Beta-lactams: Mode of action and mechanisms of bacterial resistance. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 4th ed. ed. Baltimore: Williams & Wilkins. 1996. 502-78.

Livermore DM, Brown DFJ. Detection of β -lactamase-mediated resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2001; 48:1:59-64.

Martin RM, Bachman MA. Colonization, Infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(4):1-15.

Matthew M. Plasmid mediated β -lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother*. 1979;5:349-58.

Medeiros AA, Hare RS. Beta-lactamase mediated resistance to penems and carbapenems amongst *Enterobacteriaceae*, 1986; 18(2):306-325

Medeiros AA. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. *Clinic. Infect. Dis*. 1997;24:19-45.

Medeiros AA. Cooperative evolution of mechanisms of beta-lactam resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2000;6(3):27-33.

Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin. Microbiol. Infect*. 2010; 16:112–22.

Naas T, Nordmann P. OXA-type β -lactamases. *Curr. Pharm*. 1999;5:865-79.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis*. 2011;17:1791–98.

Nordmann P. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):821-30

Orskov I. O antigens in the *Klebsiella* group. *Acta Pathol. Microbiol. Scand*. 1954; 34: 145–56.

Özsoy F. GSBL: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar. *Flora dergisi*. 2001; 6(1):321.

Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: Going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629-61.

Page MGP, Bush K. Discovery and development of new antibacterial agents targeting Gram-negative bacteria in the era of pandrug resistance: is the future promising? *Curr Opin Pharmacol*. 2014;18: 91–97.

Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55 (11): 4943–60.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2009; 47(6): 1631-9.

Petersen-Morfin S, Bocanegra-Ibarias P, Morfin-Otero R, Garza-González E, Perez-Gomez HR, et al. New Delhi Metallo-Beta-Lactamase (NDM-1)-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from a Burned Patient. *Am J Case Rep.* 2017; 18(18): 805-9.

Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46(1): 1–11.

Pillai DR, Melano R, Rawte P, Lo S, Tijet N, Fuksa M, Roda N, Farrell DJ, Krajden S. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(5):827-9.

Praveen R, Om P, Shouche, YS. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based microbial identifications: challenges and scopes for microbial ecologists. *Front. Microbiol.* 2016; 7(4), 13-59.

Poirel L, Özdamar M, Ocampo-Sosa A, Türkoğlu S, Özer UG, Nordmann P. NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2784–5.

Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep.* 2018; 20(6):13-18.

Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589-603.

Ribeiro V, Linhares AR, Zavascki AP. Performance of quantification of Modified Hodge Test: An Evaluation with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* isolates. *Biomed Res Int.* 2014; 6: 25–64.

Queenan AM, Foleno B, Gownley C, Wira E, Bush K. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42: 269-75.

QueenanAM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007;20:440-58.

Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997;41:223-32.

Richmond MH, and Sykes RB. The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their possible physiological roles. *Adv. Microb. Physiol.* 1973;9:31-88.

Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R. Plasmid-determined β -lactamases identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 1983;12:507-510.

Sakanashi D, Kawachi M, Uozumi Y, Nishio M, Hara Y, et al. Evaluation of commercial phenotypic assays for the detection of IMP- or New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolates in Japan. *J Infect Chemother.* 2017;23(7):474-80.

Sanders CC. Beta-lactamases of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis.* 1992;14:1089-99.

Seibert G, Hörner R, Meneghetti BH, Righi RA, Dal Forno NL, Salla A. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. *Einstein.* 2014;12(3):282-6.

Simoons-Smit AM, Verweij-van Vught JJ, MacLaren DM. The role of K antigens as virulence factors in *Klebsiella*. *J. Med. Microbiol.* 1986;21:133-7.

Spadafino JT, Cohen B, Liu J, Larson E. Temporal trends and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in adults with catheter-associated urinary tract infections. 2014;3(1):39.

Sully EK, Geller BL, Li L, Moody CM, Bailey SM, Moore AL, Wong M, Nordmann P, Daly SM, Sturge CR, Greenberg DE. Peptide-conjugated

phosphorodiamidate morpholino oligomer (PPMO) restores carbapenem susceptibility to NDM-1-positive pathogens in vitro and in vivo. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72(3):782-90.

Siegel JD, Rhinehart E, Jackson M, Chiarello L. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006, *Am J Infect Control* 2007;35:165-93.

Lo TS, Borchardt SM, Welch JM, Rohrich MA, Alonto AM, et al. Doripenem in hospital infections: a focus on nosocomial pneumonia, complicated intra-abdominal infections, and complicated urinary tract infections *Infect Drug Resist.* 2009;2:41-9.

Ulusoy S. Antibakteriyel ajanlar. *Turkiye Klinikleri J Urology.* 2004; 1(2):187-96.

Walsh T, The emergence and implications of metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005; 11:2-9.

Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 373-83.

Turner PJ. Susceptibility of meropenem and comparators tested against 30,634 *Enterobacteriaceae* isolated in the MYSTIC ProGramme (1997-2003). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004;50:291-93.

Zhanel GG, Ketter N, Rubinstein E, Friedland I, Redman R. Overview of seizure-inducing potential of doripenem. *Drug Saf.* 2009;32(9):709-16.

T.C.
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
İLAÇ VE TIBBİ CİHAZ DIŞI ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

Toplantı Sayısı:57

Toplantı Tarihi: 17.11.2017

Karar Sayısı:2017/1092;Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Metin DOĞAN' ın "Kan kültürlerinde üreyen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında, karbapenemaz direncinin matris destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu-uçuş zamanı kütle spektrometresi ile belirlenmesi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması ile ilgili 14.11.2017 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü, Abdullah Yücel BABA' nın yüksek lisans tez çalışmasının Fakültemiz Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Metin DOĞAN' ın sorumluluğunda bütçe desteğinin sağlandığına dair belgenin İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kuruluna sunulduktan sonra çalışmanın başlamasının uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.
Not: Çalışma ile ilgili gerekli izin ve yasal sorumluluk araştırmacılara aittir.
Sorumlu Araştırmacı: Doç. Dr. Metin DOĞAN
Yardımcı araştırmacı: Abdullah Yücel BABA

ASLI GİBİDİR

17.11.2017

Prof. Dr. Ayşe S. SAHİN

İlaç ve Tıbbi Cihaz Dışı Araştırmalar Etik Kurul Başkan Yardımcısı