T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLEBSIELLA PNEUMONIAE KÖKENLERİNDE KOLİSTİN DİRENCİNİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ VE DİRENCİN MALDI-TOF YÖNTEMİYLE HIZLI SAPTANMASI

SEÇİL İSKENDER

DANIŞMAN
PROF. DR. ÖMER KÜÇÜKBASMACI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2019

TEZ ONAYI

Bu çalışma 17.10.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

TEZ JÜRİSİ

Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa
Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU
İstanbul Üniversitesi
İstanbul Tıp Fakültesi
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

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

Seçil İSKENDER



İTHAF

Hayatımıza yeni bir renk olarak katılan yeğenim

Yiğit Ömer ARZU'ya ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince değerli bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeden katkılarda bulunan Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e,

Akademik eğitimim boyunca bilgi ve desteği ile yanımda olan, tez çalışmamın her aşamasında tecrübeleri ile bana öngörüler sağlayan, aldığım eğitimin gelişmesinde büyük emeği olan saygıdeğer hocam Sayın Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya,

Akademik eğitimim boyunca sağladıkları katkılar ve destekleri için değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hrisi BAHAR TOKMAN, Prof. Dr. Kenan MİDİLLİ, Prof. Dr. Bekir KOCAZEYBEK, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ, Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ, Prof. Dr. Sevgi ERGİN, ve Öğr. Gör. Mert Ahmet KUŞKUCU'ya,

Tez çalışmam için olanak sağlayan Medipol Üniversitesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı yöneticisi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşe İSTANBULLU TOSUN'a,

Tez çalışmam sırasında gerekli olan biyoanalitik hesaplamalar hususunda tecrübe ve bilgi birikimlerini benimle paylaşarak tezime katkıda bulunan Saddam HEYDAROV'a

Laboratuvar çalışmalarım için desteklerini, bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kıymetli çalışanlarına, bilhassa Nida AYDIN, Huriye YILDIZ ve Zeynep YAZGAN'a,

Yüksek lisans eğitim ve tez sürecimde yanımda olan, bu süreçte karşılaşılması muhtemel olan sorunlar hakkında tecrübelerini ve yardımlarını benden esirgemeyen aynı bölümü paylaştığım Doktora ve Yüksek Lisans öğrencisi arkadaşlarım Zeynep TANER, Harika Öykü DİNÇ, Yağmur Eylül DOĞANTÜRK, Burcu Nur AYDIN, Merve EĞRİBEL, Edip TOKUÇ'a

Lisans eğitimimden bu yana dostluğu ile her zaman yanımda olan, tez sürecim boyunca ise destek ve yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşım Şeydanur TURGUT'a,

Eğitim hayatım boyunca verdiğim kararlarda arkamda olan ve eğitimim için maddi manevi desteğini esirgemeyen başta annem Safiye İSKENDER, babam Şükrü İSKENDER ve ablam Burcu İSKENDER olmak üzere, gelişmem ve ilerlememde büyük katkıları olan tüm aileme her koşulda yanımda oldukları ve beni desteklediklerini için teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33529

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... İX
ŞEKİLLER LİSTESİ X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... Xİ
ÖZET ..... Xİİİ
ABSTRACT ..... XİV
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. *Klebsiella pneumoniae* 3
2.2. *Klebsiella pneumoniae* Klinik ve Epidemiyolojisi 7
2.3. Kullanılan Antibiyotikler ve Karşılaşılan Direnç Problemleri 8
2.4. Antibakteriyel İlaçların Etki Mekanizmaları 8
2.5. Kolistin Direnci 10
2.6. Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş Zamanı (MALDI-TOF) 10
2.7. MATLAB ile İkili Sınıflandırma Uygulaması 11
3. GEREÇ VE YÖNTEM 12
3.1. Bakteri Kökenleri 12
3.2. MALDI-TOF 12
3.3. Antibiyotik Duyarlılığının Saptanması 12
3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon 13
3.3.2. Gradiyent Şerit Test 13
3.3.3. Disk Difüzyon Testi 13
3.4. MATLAB ile Makine Öğrenimi Algoritmasının Geliştirilmesi 14
4. BULGULAR 15
4.1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları 15
4.2. MALDI-TOF Sonuçları ve MATLAB ile İkili Sınıflandırma Uygulaması 17
5. TARTIŞMA 29

KAYNAKLAR 36
ETİK KURUL KARARI 42
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....43
ÖZGEÇMİŞ 44

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* Ailesi İçindeki *Klebsiella* ve *Enterobacter* Cins ile Türlerin Ayrımı (Procop, et al., 7 th ed. 2017) 5
Tablo 2. *Klebsiella* Türlerinin Özellikleri (Bilgehan, 2009) 6
Tablo 3. Etki Mekanizmalarına Göre Antibakteriyel Ajanlar (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2016) 9
Tablo 4. Kolistin Dirençli *K. pneumoniae* Fenotipik Duyarlılık Test Sonuçları (Di: Dirençli, Du: Duyarlı) 15
Tablo 5. Kolistin Duyarlı *K. pneumoniae* Fenotipik Duyarlılık Test Sonuçları (Du: Duyarlı, Di: Dirençli) 16
Tablo 6. Sıvı Mikro Dilüsyon Testi ile Karşılaştırıldığında Diğer Fenotipik Testlerin Büyük Hata (BH) ve Çok Büyük Hata (ÇBH) Oranları 17
Tablo 7. Farklı Makine Öğrenim Modellerinin Doğruluk Oranları 27

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinin ana spektrum profili sırası ile örnek numaraları 30, 365, 564, 652, 661, 1027, 1264, 1799, 2015, 2116, 2182, 2285, 2288, 2533, 2692, 2985-84, 3011, 3080, 3249, 4484, 5013, 5534, 12397. 20
Şekil 2. Duyarlı *K. pneumoniae* kökenlerinin ana spektrum profili sırası ile örnek numaraları 546, 580, 902, 965, 966, 999, 1033, 1248, 1353, 1882, 1922, 2009, 2014, 2057, 2189, 2234, 2275, 2320, 3624, 10644, 11655460, 11672218, 11673737, 11675949, 11685657, 11689701, 11709068, 11709177, 11709684, 11710134, 11711495, 11729785. 24
Şekil 3. Tüm verilerin 2000 – 13000 spektrum aralığı 25
Şekil 4. Dirençli ve duyarlı kökenlerin ortalamaları..... 25
Şekil 5. Tüm örneklerin temel düzeltmeler sonucunda elde edilen tahmini başlangıç noktaları 26
Şekil 6. Genetik algoritma ile belirlenen 12 öznitelik 26
Şekil 7. Doğrusal SVM (%100) modeli makine öğrenim modeli için hata matriksi ve ROC grafiği..... 27
Şekil 8. Gauss SVM (%96.4) modeli için hata matriksi ve ROC grafiği 28
Şekil 9. Doğrusal Diskriminant (%98.2) modeli için hata matriksi ve ROC grafiği 28

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

ATCC **:** Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu (American Type Culture Collection)

EUCAST **:** Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

CLSI **:** Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical & Laboratory Standards Institute)

EARS-Net **:** Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetim Ağı (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)

DSÖ **:** Dünya Sağlık Örgütü

AB **:** Avrupa Birliği

AEB **:** Avrupa Ekonomik Bölgesi

GSBL **:** Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar

MALDI-TOF **:** Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş zamanı

BOS **:** Beyin omurilik sıvısı

ETA **:** Endotrakeal Aspirat

BAL **:** Bronko Alveolar Lavaj

KES **:** *Klebsiella Enterobacter Serratia*

EMB **:** Eosin Metilen Blue

SS **:** *Salmonella Shigella*

CFU **:** Koloni Şekillendirme Birimi (Colony Forming Unit)

MİK **:** Minimal İnhibitör Konsantrasyon

MHB **:** Mueller Hinton Broth

BH **:** Büyük Hata

ÇBH **:** Çok Büyük Hata

Di **:** Dirençli

Du **:** Duyarlı

ROC **:** Alıcı Operatör Özellikleri (Receiver Operator Characteristics)

SVM **:** Destek Vektör Makinesi (Support Vector Machine)

MSSA **:** Metisilin Duyarlı *Stafilokok aureus* (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MRSA **:** Metisilin Dirençli *Stafilokok Aureus* (Methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*)

PFGE **:** Darbeli Alan Jel Elektroforezi (Pulsed-field Gel Electrophoresis)

ÖZET

İskender, S. (2019). *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde kolistin direncinin çeşitli yöntemlerle incelenmesi ve direncin MALDI-TOF yöntemiyle hızlı saptanması. İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Son yıllarda karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* üyeleri özellikle *Klebsiella pneumoniae* kökenleri hızla artmaktadır. Nazokomiyal enfeksiyonların önemli bir nedeni olan *Klebsiella pneumoniae* acil halk sağlığı dikkatini gerektirmektedir. Bu kaygının ana nedeni son çare antibiyotiklerden biri olan kolistine karşı artan dirençtir. Tedavide elimizdeki son etkili antibiyotiklerden biri olan kolistine başvurulurken, kolistin direncinin hızlı bir şekilde saptanabilmesi ve tedaviye başlanılması önemli noktalardan biridir. Kolistin duyarlılık testi için ideal bir metodoloji tam olarak tanımlanamamıştır. Ancak EUCAST verilerinin önerileri doğrultusunda kolistin direncinin saptanmasında en başta sıvı mikro dilüsyon metodu yer almaktadır. Fenotipik antibiyotik duyarlılık testleri arasında önerilen disk difüzyon ve gradiyent strip testler kolistin direncini saptamada güvenilir bulunmamaktadır. Matriks aracılı lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometrisi-Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF) son zamanlarda klinik ve genel mikrobiyoloji laboratuvarlarında bakteri ve mantar tanımlamasında sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Elde ettiğimiz duyarlı ve dirençli *K. pneumoniae* suşları ile MALDI-TOF'ta bir veri tabanı oluşturarak, genetik algoritma yardımı ile kolistin direncinin erken saptanması amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, Kolistin, Antibakteriyel Direnç, Direnç Mekanizmaları, MALDI-TOF

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 33529

ABSTRACT

Iskender, S. (2019). Investigation of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains by various methods and rapid determination of resistance by MALDI-TOF method. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Medical Microbiology. Master Thesis. İstanbul.

In recent years, carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* members, especially *Klebsiella pneumoniae* strains are rapidly increasing. *Klebsiella pneumoniae*, the notorius cause of nasocomial infections, requires immediate public health attention. The main reason for this concern is the increased resistance to colistin, one of the last resort antibiotics. Detecting colistin resistance rapidly is very crucial for these life threatining bacterial infections. An ideal methodology for colistin susceptibility testing has not been fully defined. However, in line with the recommendations of EUCAST data, liquid microdilution method is the reliable test for determining colistin resistance. The phenotypic antibiotic susceptibility tests such as disc diffusion and gradient strip tests are not found reliable for detecting colistin resistance. Matrix-assisted laser desorption ionization flight time mass spectrometry (MALDI-TOF) has recently been used frequently in the identification of bacteria and fungi in clinical and general microbiology laboratories. We aimed to detect colistin resistance instantly by using a genetic algorithm within a MALDI-TOF database created by sensitive and resistant *K. pneumoniae* strains.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, Colistin, Antibacterial Resistance, Resistance Mechanisms, MALDI-TOF

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 33529

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde sağlık kuruluşlarının, yapılarının önde gelen ve gerçekten ürkütücü sorunlarından biri çoğul ilaçlara dirençli mikroorganizmaların olmasıdır. Kolistin, çoklu dirençli enfeksiyonların tedavisinde kullanılmakta olan son derece önemli bir antibiyotiktir. İlk çıktığında çok fazla toksik etkisinin olduğu ve kullanımının kısıtlandığı bu antibiyotik, çoklu direnç karşısında çaresiz kalan klinisyenler ve tıbbi otoriteler tarafından tekrar kullanıma sokulmuştur. Antibiyotikler kullanılmaya başladığından bu yana, antibiyotiklere karşı direnç hızla gelişmiştir. Direncin nedenleri oldukça kompleks olup doğal dirençten, aşırı antibiyotik kullanımına kadar birçok farklı neden söylenebilir. Günümüzde antimikrobiyal kematerapötiklere karşı direnç elde etmiş bulunan mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların sağaltımını yapmak oldukça zorlaşmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'nün tahmini verilerine bakıldığında, antibiyotikler ile ilgili bir önlem alınmaz ise 2050 yılında antibiyotiklere dirençli süper bakterilerin milyonlarca insan kaybına sebep olacağı öngörülmektedir. (World Health Organization, 2017) Başlıca önlem olarak antibiyotiklerin gereksiz kullanımının önlenmesinin dışında bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmasının nasıl olduğunun anlaşılması ve bu yayılımın önlenmesi gerekmektedir. İnsanlarda hastalığa neden olabilen önemli patojenler *Enterobacteriaceae* üyeleri farklı ve çok sayıda direnç determinantını birlikte barındırır ve birçok farklı grup antibiyotiğe dirençli olabilmektedirler. Çoklu antibiyotik direncine sahip *K. pneumoniae* kökenleri antibiyotiklere karşı dirençte ciddi sorun oluşturmaktadırlar. Genellikle *Klebsiella* cinsi *Enterobacteriaceae* ailesinde ilk olarak direnç determinantlarına sahip olmakla ünlüdür daha sonra bu direnç öğeleri *Escherichia, Enterobacter* gibi diğer üyelere de hızla geçmektedir. Genişletilmiş sprektrumlu beta-laktamaz üretimi, karbapenemaz üretimi, dış membran değişikleri, eflüks pompaları gibi birçok özellik dirençte tek başına veya birlikte rol oynayabilirler. Kolistin eski bir antibiyotiktir, yan etkileri ve daha yeni antibiyotiklerin keşfi ile uzun yıllar kliniklerde kullanımı kısıtlı kalmıştır. (İstanbul Üniversitesi Yayınları, 2011) Ancak günümüzde panrezistans yani elimizdeki tüm antibiyotiklere dirençli bakteriler nedeniyle günümüzde büyük önem kazanmıştır. Bu çoğul dirençli bakterilerde kolistin direncinin gelişmesi son derece önemlidir. Kolistin

direncinin sıklığı, direncin hangi yöntemlerle daha doğru saptandığı ve direncin temellerinin araştırılması önem kazanmıştır. (Du, Chen, Tang, & Kreiswirth, 2016)

Bu tez çalışmasında, İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa – Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen örneklerden elde edilen kolistin dirençli ve duyarlı kökenler ile yapılacak çalışmalar sonucunda direncin hangi fenotipik yöntemle doğru saptanabileceği dışında, MALDI-TOF ile de saptanıp, saptanamayacağı amaçlanmıştır. Bu direnç özelliklerinin erken saptanmasının çoğul dirençli süper mikroorganizmaların yarattığı tahribatı azaltacağını ve bize sağaltım için mümkün olan en kısa zamanda bir rehber olacağı düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

Enterobacteriacae ailesi hastane enfeksiyonlarında en önemli gram-negatif basiller içinde yer almaktadır. *Enterobacteriacae* ailesinde bulunan ve tıbbi açıdan önemli kabul edilen bakteri cinsleri; *Klebsiella, Esherichia, Enterobacter, Salmonella, Shigella, Proteus, Serratia, Citrobacter* ve *Yersinia*'dır. (Erdem, 1999) (Baçıkçan, 2004) (Baysal, 2004)

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella cinsi ondokuzuncu yüzyıl sonlarında Alman bilim insanı Edwin Klebs onuruna adlandırılmıştır. Aynı zamanda Carl Friedlander tarafından da tanımlanmış olduğu için uzun yıllar boyunca "Friedlander basili" adıyla anılmıştır. Altı tür içermektedir. Bunlar; *K. pneumoniae, K. oxytoca, K. granulomatis, K. variicola, K. singaporensis* ve *K. alba*'dır. Aralarında en sık rastlanılanı *K. pmeumoniae*'dir. (Procop, et al., 7 th ed. 2017)

Enterobacteriaceae ailesinde *Klebsiella*, hareketsiz ve kapsüllü oluşu ile ayırt edilebilir. Doğada, su ve toprak gibi çevresel ortamlarda, memelilerin mukozal yüzeylerinde kolonize olabilen türlerdir. (Podschun & Ullmann, 1998) (Töreci, 2002)

Klebsiella cinsi bakteriler hücre yüzeyinde 2 tip antijen açığa çıkarmaktadırlar. İlki lipopolisakkarid (O antijeni), ikincisi ise kapsüler polisakkariddir (K antijeni). Patojeniteye bu iki antijen yapısı da katkıda bulunmaktadır. Antijenlerin yapısal değişkenliği sebebi ile *Klebsiella* cinsinin farklı serotiplere ayrılmasını mümkün kılmaktadır. İnsanlarda hastalık etkeni olarak kabul edilen üç tür vardır. Bunlar; *K. pneumoniae, K. oxytoca* ve *K. granulomatis*'tir. (Hoppe, Bier, & Nickisch-Rosenegk, 2014) (Boye & Hansen, 2003)

Morfolojik olarak bakıldığında, yuvarlak uçlu 1-2 µm boy ile 0,5-0,8 µm en oranlarına sahip hareketsiz ve sporsuz gram-negatif bakterilerdir. Gram boyama ile bakıldığında genellikle kısa zincir şeklinde gözlemlenmektedirler. (Baçıkçan, 2004) (Töreci, 2002) *Klebsiella'*ların izolasyonu aşamasında, klinik örneklerin steril vücut bölgelerinden olması durumunda izolasyonda zorluk görülmemektedir, ancak steril

olmayan vücut bölgeleri veya çevreden izolasyon gereken durumlarda özel besiyerleri kullanılması gerekmektedir. (Abbott, 2009)

Enfeksiyon şüphesi ile klinik mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilen idrar, balgam, apse, dren sıvısı, periton sıvısı, doku, ETA, BOS, BAL, katater ucu gibi steril vücut bölgelerinden ve steril olmayan vücut bölgelerinden alınan örneklere uygulanan prosedürler ile katı besiyerlerine yapılan ekim sonucunda elde edilen izolatların identifikasyonu yapılabilmektedir. (Baçıkçan, 2004)

Klebsiella'lar aerob ve fakültatif anaerob olmaları sebebi ile 37ºC'de ve optimal pH'da 24 saatlik inkübasyonları sonucunda ürerler. Katı besiyerlerinde mukoid yapıda büyük sarımtırak gri renkte koloniler oluşturmakadırlar. Bunun dışında bazı seçici besiyerleri de *Klebsiella'*ların identifikasyonu aşamasında yardımcı olarak kullanılmaktadır. Mc Conkey agar'da kırmızı, EMB agar'da morumsu, kromojenik agar'da metalik mavi, Hektoen agar'da sarı-turuncu, SS agar'da pembe koloniler oluşturarak identifikasyon aşamasında *Klebsiella* türünü düşündürmektedirler. (Bilgehan, 2009)

Klebsiella türlerinin tümünde mukoid yapı görülmemekle birlikte *Enterobacter* türlerinin bazıları tarama testlerinde *Klebsiella* türleri ile karıştırılmaktadır. Benzer özelliklere sahip bazı *Klebsiella* ve *Enterobacter* cinsi bakterilerin identifikasyonunu sağlayacak olan biyokimyasal özellikleri ile ayırımı Tablo 1'de gösterilmektedir. (Baçıkçan, 2004) (Procop, et al., 7 th ed. 2017)

Klebsiella alt türlerinin birbirinden ayırt edilebilmesi için belli biyokimyasal özelliklere verdikleri tepkiler Tablo 2'de şematize edilmiştir. (Bilgehan, 2009)

Tablo 1. *Enterobacteriaceae* Ailesi İçindeki *Klebsiella* ve *Enterobacter* Cins ile Türlerin Ayrımı (Procop, et al., 7 th ed. 2017)

Biyokimyasal Test	***Klebsiella***		***Enterobacter***	
	K. pneumoniae	***K. oxytoca***	***E. aerogenes***	***E. cloacae***
İndol	-	+	-	-
Hareket	-	-	+	+
Lizin	+	+	+	-
Arjinin	-	-	-	+
Ornitin	-	-	+	+
DNaz (25ºC)	-	-	-	-
Jelatinaz (22ºC)	-	-	-	-
Fermantasyon:				
Laktoz	+	+	+	+
Sükroz	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+
Adonitol	+	+	+	D (25)
Arabinoz	+	+	+	+

+, %90 veya daha fazla suş pozitif; -, %90 veya daha fazla suş negatif; D, suşların %11-89'u pozitif; parantez içindeki sayılar pozitif reaksiyon veren suşların yüzdesidir.

Tablo 2. *Klebsiella* Türlerinin Özellikleri (Bilgehan, 2009)

	K. pneumoniae	***K. ozaenae***	***K. rhinoscleromatis***	***K. oxytoca***	***K. terrigena***	***K. planticola***
Metil Kırmızısı	-	+	+	-	+	D
İndol	-			+	-	D
Voges Proskauer	+	-	-	+	+	+
Sitrat	+	D	-	+	+	+
44,5ºC'de laktozdan gaz	+			-	-	-
+10 ºC'de üreme	-	-	-	+	+	+
Laktoza etki	+	G	G	+	+	+
Malonat	+	-	+	D	D	+
Üreaz	+	D	-	+	+	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+
Arjinin dihidrolaz	-	D	-	-	-	-
H_2S	-			-	-	-
+ : olumlu, - : olumsuz, D: değişik, G: gaz oluşturma						

2.2. *Klebsiella pneumoniae* Klinik ve Epidemiyolojisi

Klebsiella klinik örneklerden sık izole edilen patojenler arasında yer almaktadır. Yatan ve ayakta hasta gruplarında akciğer ve diğer organlarda ciddi enfeksiyonlar oluşturmaktadır. *K. pneumoniae*'nın klinik olarak spesifik bir semptomu bulunmamaktadır. Uzun süreli olarak hastane koşullarında olan ve yoğun bakım hastalarında sık karşılaşılan bir patojen olmasının sebebi; hastane koşullarında bulunan invaziv cihazların varlığı, idrar sondası, uzun süreli serum kullanımı ve solunum destek ekipmanlarının kontaminasyonu gibi etkenlerdir. Enfeksiyon bölgesine göre hastada; pnömoni, idrar yolu enfeksiyonu, bakteriyemi, diyare, üst solunum yolu enfeksiyonu, yara enfeksiyonu ve sepsis gibi vakalara neden olabilmektedir. Yapılan araştırmalar ile elde edilen sonuçlara göre hastane kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık olarak %8'i *K. pneumoniae* kaynaklı olarak kaydedilmiştir. (Martin & Bachman, 2018) (Nordmann, Naas, & Poirel, Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae., 2011)

Yapılan araştırmalar OXA-48 tip karbapenemazların ülkemiz açısından endemik olduğunu göstermiştir. *Klebsiella pneumoniae* başta olmak üzere, OXA-48 tipi enzimi ve varyantlarını bulunduran enterik bakterilerin en önemli konakçısı, Akdeniz ülkeleridir. Bunun dışında ülkemizde NDM-1 tip karbapenemazların ve VIM tipi karbapenemazlar da bulunmaktadır. (Nordmann, Naas, & Poirel, Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae., 2011) (Carrër, Poirel, Eraksoy, Cagatay, Badur, & Nordmann, 2008) (Nordmann & Poirel, The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide., 2014)

Dolaşım sistemi enfeksiyonlarında başlıca etkenler arasında yer alan *K. pneumoniae* kan kültürlerinden yüksek oranlarda izole edilmektedir. Bu izolatların büyük bir kısmında karbapenemlere dirençli *K. pneumoniae* yer almaktadır. Dirençli *Klebsiella*'ların sayısındaki artış mortalite ve morbiditede artışı da beraberinde getirmektedir. Böylece tedavi sürecinin uzamasına ve maliyetin artışına neden olmaktadır. (Iraz, et al., 2015) (Poirel, Özdamar, Ocampo-Sosa, Türkoglu, Ozer, & Nordmann, 2012) (Emonet, Shah, Cherkaoui, & Schrenzel, 2010)

Karbapenemaz enzimini kodlayan genlerin plazmidler aracılığı ile horizontal olarak yayılımı karbapenem direncinin hızla yayılmasının nedenidir. direncinin hızla gelişmeye devam etmesinin temel sebebi karbapenemaz sentezinin durdurulamaması sonucunda enzimi kodlayan genlerin plazmidler aracılığı ile direnç yayılımını horizontal

olarak gerçekleştirmeye devam etmesidir. Hastalar için uygun tedavinin belirlenebilmesi için direnç yayılımına sebep olan nedenlerin doğru şekilde saptanması büyük önem taşımaktadır. (Demiray, Aydemir, Kılıç, Yılmaz, Köroğlu, & Altındiş, 2017)

2.3. Kullanılan Antibiyotikler ve Karşılaşılan Direnç Problemleri

K. pneumoniae ve diğer ciddi gram negatif çomak infeksiyonları için kullanılan başlıca antimikrobiyaller üçüncü nesil sefalosporinler, karbapenemler gibi oldukça güçlü beta-laktam antibiyotiklerdir. (Bassetti, et al., 2018) (Porreca, Sullivan, & Gallagher, 2018)

Son yıllarda beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençten dolayı *Klebsiella* enfeksiyonlarının tedavisi sırasında antibiyogramın önemine dikkat edilmektedir. Karbapenemaz parçalayan enzimleri içeren bakterilerde aminoglikozitler, polimiksinler, kolistin gibi günümüz tıbbında son sığınaklar olarak tarif edebileceğimiz antimikrobiyallerin tedavilerde uygulanması zorunlu olmaktadır. Çoklu ilaca dirençli olgularda karbapenem kombinasyonları meropenem–vaborbaktam, seftazidim/avibaktam gibi antibiyotikler kullanılmaktadır. (Porreca, Sullivan, & Gallagher, 2018) (Boyle & Zembower, 2015)

Tedavilerin belirlenmesi yan etki, enfeksiyona etkililik ve fiyat gibi unsurlara dikkat edilerek değerlendirilmelidir. Beta-laktam grubu antibiyotikler güvenilir ve kolay bulunabilir olmalarına karşın, beta-laktamaz ve karbapenemaz üreten izolatlara etki gösterememeleri sebebi ile tercih edilememektedir. Kolistin ve polimiksin bu izolatlara karşı öldürücü etkiye sahip olsa bile nefrotoksisite gibi ciddi yan etkileri sebebi ile kullanım noktasında kısıtlı antibiyotikler arasında kalmaktadır. (Bassetti, et al., 2018) (Bassetti & Righi, New antibiotics and antimicrobial combination therapy for the treatment of gram-negative bacterial infections., 2015)

2.4. Antibakteriyel İlaçların Etki Mekanizmaları

1920 yılında Penisilin keşfinden şimdiye dek birçok antimikrobiyal ilaç klinik kullanım için geliştirilmiştir. Geliştirilen antibiyotikler etki mekanizmaları dikkate alınarak belirli gruplar halinde sıralanmıştır. Bu sınıflandırmanın şematize edilmiş hali Tablo 3'te gösterildiği gibidir. (Joseph, C, C, & Moellering, 2009) (Çolak, 1999)

Tablo 3. Etki Mekanizmalarına Göre Antibakteriyel Ajanlar (Engelkirk & Duben-Engelkirk, 2016)

Etki Mekanizması	**Ajan**	**Bakterisidal veya Bakteriyostatik**
Hücre duvarı sentezinin inhibisyonu	Aztreonam	Bakterisidal
	Basitrasin	Bakterisidal
	Karbapenem	Bakterisidal
	Sefolosporinler	Bakterisidal
	Daptomisin	Bakterisidal
	Fosfomisin	Bakterisidal
	Penisilinler ve yarı sentetik penisilinler	Bakterisidal
	Vankomisin	Bakterisidal
Protein sentezinin inhibisyonu	Aminoglikozidler	Bakterisidal
	Kloramfenikol	Bakteriyostatik
	Klindamisin	İlaç konsantrasyonu ve bakteri türüne bağlıdır
	Eritromisin ve diğer makrolidler	Bakteriyostatik (genellikle); yüksek dozda bakterisidal
	Ketolidler	Bakteriyostatik
	Linezolid	Bakteriyostatik
	Mupirosin	Bakteriyostatik
	Streptograminler	Bakterisidal
	Tetrasiklinler	Bakteriyostatik
Nükleik asit sentezinin inhibisyonu	Rifampin	Bakterisidal
	Kinolonlar ve florokinolonlar (siprofloksasin, levofloksasin, moksifloksasin)	Bakterisidal
DNA hasarı	Metronidazol	Bakterisidal
Hücre zarında bozulma	Polimiksin B ve polimiksin E (kolistin)	Bakterisidal
Enzim aktivitesinin inhibisyonu	Sülfonamidler	Bakteriyostatik
	Trimetoprim	Bakteriyostatik
***Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilere karşı etkilidir, ancak spektrum her bir antimikrobiyal ajana göre değişebilir.**		

2.5. Kolistin Direnci

Gram negatif mikroorganizmalarda tedavi seçeneği daha kısıtlıdır. *K. pneumoniae* gibi dirençli bakteriler için kolistin ve polimiksin gibi antibiyotikler etkili olsa da, yan etkisi olan nefrotoksisite dolayısıyla kullanımı kısıtlı antibiyotiklerdendir. (Procop, et al., 7 th ed. 2017) (Töreci, 2002) Ancak karbapenem dirençli türler ile mücadelede kolistin önemli bir ajandır. Kolistin ile kombine edilen antibiyotik tedavileri bakteriyemili hastalarda mortaliteyi azaltmaktadır. (Abbott, 2009) Son zamanlarda kolistin dirençli türlerin ortaya çıkması dirençli suşların tedavisinde endişelere sebep olmaktadır. (Bilgehan, 2009) (Hoppe, Bier, & Nickisch-Rosenegk, 2014) (Boye & Hansen, 2003)

2.6. Matriks Aracılı Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu-Uçuş Zamanı (MALDI-TOF)

MALDI-TOF 1980'li yıllarını sonlarına doğru bakterilerin identifikasyonunda kullanılmıştır. (Carvalhaes, et al., 2014) (Štveráková, Šedo, Benešík, Zdráhal, Doškař, & Pantůček, 2018) 1990'lı yıllarda yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilmesi ile büyük moleküllerin incelenebilmesi imkânları sağlanmıştır. MALDI-TOF, mikroorganizmalara özgü proteinlerden, yapılardan mikroorganizmanın kalıplarının tanımlandığı piklerin karşılaştırılması ile gerçekleştirilen bir sistemdir. (Doğan, 2018) (Cobo, 2013)

Bu yöntem sayesinde özellikle de besiyerinde tanımlanamayan ve selektif medyalarda tanımlanamayan bakterilerin tespiti kolaylaşmıştır. Ayrıca bu yöntem sayesinde zaman kaybı da büyük ölçüde önlenmiş olur. Kromojenik agar besiyerinde koyu mavi renkte görünen KES grubu bakterilerinden olan ve nazokomiyal enfeksiyonlarda oldukça çarpıcı etkilere sahip olan *Klebsiella pneumoniae* bakterisi bu yöntem sayesinde *Serratia* ve *Enterobacter*lerden özellikle de yine aynı cinse ait bir üye olan ve klasik yöntemlerle bakıldığında birbirleriyle sıklıkla karıştırılabilen *Klebsiella oxytoca*'dan kolayca ayırt edilebilmektedir.

MALDI-TOF sayesinde dirençli suşların da tespit edildiği örnekler de vardır. Bu özellik tüm MALDI-TOF cihazlarında bazı yazılım destekleriyle mümkün olabilmektedir.

Bu yöntem, mikroorganizmaların içerdiği tüm komponentlerin ve organik moleküllerinin manyetik süzgeçten bir matriks aracılığı ile geçirilmesinden sonra hedefin protein izdüşümlerini çıkarmaktadır. (Joseph, C, C, & Moellering, 2009)

Mikroorganizmaların protein şekillerine ait grafik imajlar elde edilmekte ve sistemin veri tabanındaki referans bakteri veya mantarın örneğine yakınlığına veya uymasına göre bakteriler ve mantarlar tür düzeyinde bazen de cins düzeyinde olacak şekilde çok hızla saptanabilmektedir. (Martin & Bachman, 2018) Bu yöntem yakın bir gelecekte belki de virüsleri tanımlamakta da kullanılabilecektir. Moleküler yöntemlerin mikrobiyoloji alanında kullanımı ile birlikte birçok ilerleme kaydedilmiştir. Mikrobiyolojik örneklerin incelenmesinde matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon havada kalma süresi (MALDI-TOF) önemli ürünlerinden biri olarak son yıllarda yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. (Nordmann, Naas, & Poirel, Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae., 2011)

Bakteriyoloji, mantarlar gibi alanlarda mikroorganizmanın hızlı tespit edilebilmesi için araştırmalarda MALDI-TOF sistemi kullanılmasının yanısıra bu yöntemin mikroorganizma direnç determinantlarının saptanmasında da kullanılabileceği bildirilmektedir. (Çolak, 1999) Böylece hem hızlı identifikasyon hem de direnç profili elde etmek mümkün olabilecektir. (Nordmann, Naas, & Poirel, Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae., 2011) (Carrër, Poirel, Eraksoy, Cagatay, Badur, & Nordmann, 2008) Böyle gelişmeler laboratuvarlarımızın tamamen yepyeni bir hal almasına yardımcı olacaktır. (Çolak, 1999)

2.7. MATLAB ile İkili Sınıflandırma Uygulaması

Dördüncü nesil programlama dili olan MATLAB (Matrix Laboratory), çok paradigmalı sayısal hesaplama yazılımına sahiptir. Belirli ihtiyaçlar amacıyla kullanılması için kullanımı kolay, hazır şablon ve daha az kod yazılarak pratik çözümler geliştirmeye yönelik bir dildir. Kullanıcı arayüzü oluşturmak için; matris işlemleri, fonksiyon ve veri çizme, algoritma geliştirme gibi biyoanalitik çalışmalara imkanlar sağlar. (Dat, Shue, & Guan, 2006)

Sınıflandırma aşamasında MATLAB kullanımı için İstatistikler ve Makine Öğrenimi Araç Kutusu'na dahil edilen Öğrenen Sınıflandırma Uygulaması (Classification Learner App) kullanılır. Öğrenen Sınıflandırma Uygulaması verilerin sınıflandırılmasında modelleri eğitmek için makine öğrenimi yöntemleri kullanan bir uygulamadır. Verilerin araştırılması, doğrulanması ve eğitilmesi aşamasında Sınıflandırma Öğreneni kullanılabilir. (Maleki, Manshouri, & Kayikcioglu, 2017)

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Farklı hasta örneklerinin kültürlerinden elde edilmiş *K. pneumoniae* kökenlerinin kolistine karşı duyarlılıkları; sıvı mikro dilüsyon, Kirby-Bauer disk difüzyon ve gradiyent şerit test (e-test) yöntemleri ile karşılaştırılmıştır. Dirençli suşların MALDI-TOF yöntemiyle hızlı saptanması amaçlanmıştır.

3.1. Bakteri Kökenleri

Yüksek lisans tez projesi kapsamında deneysel bir çalışma olarak planlanan ve yürütülen çalışmamız; İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırmalar Proje Birimi (BAP) tarafından desteklenen "*Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde kolistin direncinin çeşitli yöntemlerle incelenmesi ve direncin MALDI-TOF yöntemiyle hızlı saptanması" bir tez projesi olarak planlanmıştır. Çalışmamıza 2015 – 2019 tarihleri arasında İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarları'na gelen örneklerden hazırlanan kültürlerde üreyen 55 *K. pneumoniae* kökeni dâhil edilmiştir. Bakterilerin identifikasyonu MALDI-TOF (Bruker, Germany) cihazı ile yapılmıştır. Bu kökenler standart yöntem olarak bilinen sıvı mikro dilüsyon yöntemine göre duyarlı ve dirençli kökenler olmak üzere iki gruba ayrılmıştır.

3.2. MALDI-TOF

Bakterilerin identifikasyonu için MALDI-TOF (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Almanya) kullanılarak MALDI Biotyper MSP identifikasyon standart metot ve FlexAnalysis v3.0 yazılımı (Bruker Daltonics) ile suşlara ait isimlendirme sonuçları ve spektrumlar elde edilmiştir. Bu spektrumlar identifikasyon yanı sıra direnç determinantlarını saptayabilmek için kullanılmıştır.

3.3. Antibiyotik Duyarlılığının Saptanması

Kültürlerde üreyen *K. pneumoniae* kökenlerinde kolistin duyarlılığının belirlenmesi için sıvı mikro dilüsyon yöntemi kullanılmış, disk difüzyon ve gradiyent şerit test yöntemlerindeki performansları değerlendirilmiştir. *E.coli* ATCC 25922 kökeni duyarlılık testleri için kontrol olarak çalışılmıştır.

3.3.1. Sıvı Mikrodilüsyon

Sıvı mikro dilüsyon yönteminde EUCAST önerilerine bakılarak katyon ayarlı Mueller Hinton II Broth (BD, ABD) kullanılmıştır. (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019) Bakteriler bir gece Mueller-Hinton agar besiyerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra bu pasajlardan 0,5 McFarland ($1x10^8$ CFU/ml) türbiditesinde bakteri süspansiyonları 1/10 oranında sulandırılmıştır ve nihai olarak yaklaşık $5x10^5$ CFU/ml bakteri sayısı elde edilmiştir. 2 kat seri dilüsyon 0,25 - 128 µg/ml konsantrasyonları sınırlarında sulandırılmış kolistin sülfat (Sigma C4461) eklenerek oluşturulmuş mikrodilüsyon plaklarına *K. pneumoniae* kökenleri eklenmiştir. Kontrol amaçlı bir kuyucuğa bakteri eklenmemiş ve başka bir kuyucuğa da antibiyotik içermeyen besiyeri eklenmiştir. İnoküle edilen plaklar 24 saat 36±1^{o}C'de inkübe edilmiştir. 24 saat sonunda gözle görülebilen bulanıklığın bulunmadığı tüpteki antibiyotik konsantrasyonu minimal inhibitör konsantrasyon (MİK) değeri kabul edilmiştir. Bu aşamalara EUCAST kriterleri doğrultusunda yorum yapılmıştır. (T.C. Sağlık Bakanlığı , 2019) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015)

3.3.2. Gradiyent Şerit Test

Kolistin Gradiyent Şerit Test (Biotest) kullanılmış, kökenlerin 0,5 McFarland türbiditesinde süspansiyonu Mueller Hinton agar besiyerine (BD) düzgün inokülasyonla ve homojen olarak ekilmiştir. Bir gün 35±1^{o}C'de ve normal atmosfer koşullarında yapılan inkübasyonu sonucunda strip üzerindeki inhibisyon zonu ile kesişen en yukarıdaki konsantrasyonu kolistin için MİK değeri olarak saptanmış ve referans olarak EUCAST'in belirlediği standartlar esas alınarak değerlendirilmiştir. (Kahlmeter, et al., European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria., 2003) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015)

3.3.3. Disk Difüzyon Testi

Mueller Hinton Agar besiyerine yapılan 0,5 Mc Farland bulanıklığındaki *K. pneumoniae* süspansiyonunun düzgün ve her yere eşit yoğunlukta yayılmasından sonra kolistin içeren disk yerleştirilmiştir. Zon çapı 13 mm ve daha az olan kökenler dirençli kabul edilirken, 14 mm ve üstü duyarlı kabul edilmiştir. (Kahlmeter, et al., European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing., 2006)

3.4. MATLAB ile Makine Öğrenimi Algoritmasının Geliştirilmesi

MALDI-TOF ile elde edilen spektrum verilerinden 23 dirençli ve 32 duyarlı kökenlerden veri seti oluşturuldu. İlk aşama olarak veri ön işlemesi yapıldı. Eğitilecek olan modelin gürültü verileri sebebi ile aşırı öğrenmesinin engellenmesi ve boyutunun küçültülerek hesaplama zamanını azaltmak amacıyla elde olan spektrum verilerinden yüksek frekanslı gürültüler çıkarıldı. Anlamlı verinin olmadığı tespit edilen spektrum aralığı çıkartıldı ve anlamlı kabul edilen 2000 – 13000 spektrum aralığında çalışma yapıldı. Farklı spektrum verilerinde referans düzeltmeleri yapılarak bütün spektrum verileri ortak bir düşük frenkasa getirildi. Spektrum yoğunlukları en yüksek yoğunluk kullanılarak normalize edildi.

Oluşturulan bu veri seti ile farklı makine öğrenimi modelleri eğitilerek doğruluğu en yüksek olan model seçildi. Yeni bir suş için aynı yöntem kullanılarak oluşturulan model ile direncin hızlı tespit edilmesi sağlanabilir.

4. BULGULAR

4.1. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Kolistin dirençli *K. Pneumoniae* fenotipik duyarlılık testler ile alınan sonuçlar Tablo 4'te, kolistin duyarlı *K. Pneumoniae* fenotipik duyarlılık testler ile alınan sonuçlar Tablo 5'te, testlerin büyük hata ve çok büyük hata oranları ise Tablo 6'da gösterilmiştir.

Tablo 4. Kolistin Dirençli *K. pneumoniae* Fenotipik Duyarlılık Test Sonuçları (Di: Dirençli, Du: Duyarlı)

Örnek	**MHB Dilüsyon**		**Gradiyent E-Test**		**Disk Difüzyon**	
	MİK	**Yorum**	**MİK**	**Yorum**	**Zon Çapı**	**Yorum**
2692	32	Di	1,5	Du	15	Du
3080	32	Di	1,0	Du	14	Du
2182	64	Di	1,5	Du	13	Di
4484	32	Di	8	Di	13	Di
2985-84	32	Di	1,0	Du	15	Du
30	32	Di	12	Di	11	Di
5534	64	Di	12	Di	12	Di
5013	16	Di	1,0	Du	14	Du
2533	128	Di	1,5	Du	13	Di
564	64	Di	24	Du	13	Di
12397	8	Di	1,0	Du	15	Du
365	64	Di	1,5	Du	14	Du
661	64	Di	2	Du	14	Du
1027	16	Di	1,5	Du	14	Du
3249	64	Di	16	Di	11	Di
652	64	Di	3	Di	14	Du
2015	16	Di	3	Di	15	Du
2285	16	Di	1,0	Du	15	Du
1264	32	Di	4	Di	14	Du
3011	4	Di	1,0	Du	15	Du
2288	16	Di	4	Di	14	Du
2116	8	Di	1,5	Du	14	Du
1799	8	Di	2	Du	14	Du
E.coli ATCC 25922	1	Du	1,5	Du	15	Du

Tablo 5. Kolistin Duyarlı *K. pneumoniae* Fenotipik Duyarlılık Test Sonuçları (Du: Duyarlı, Di: Dirençli)

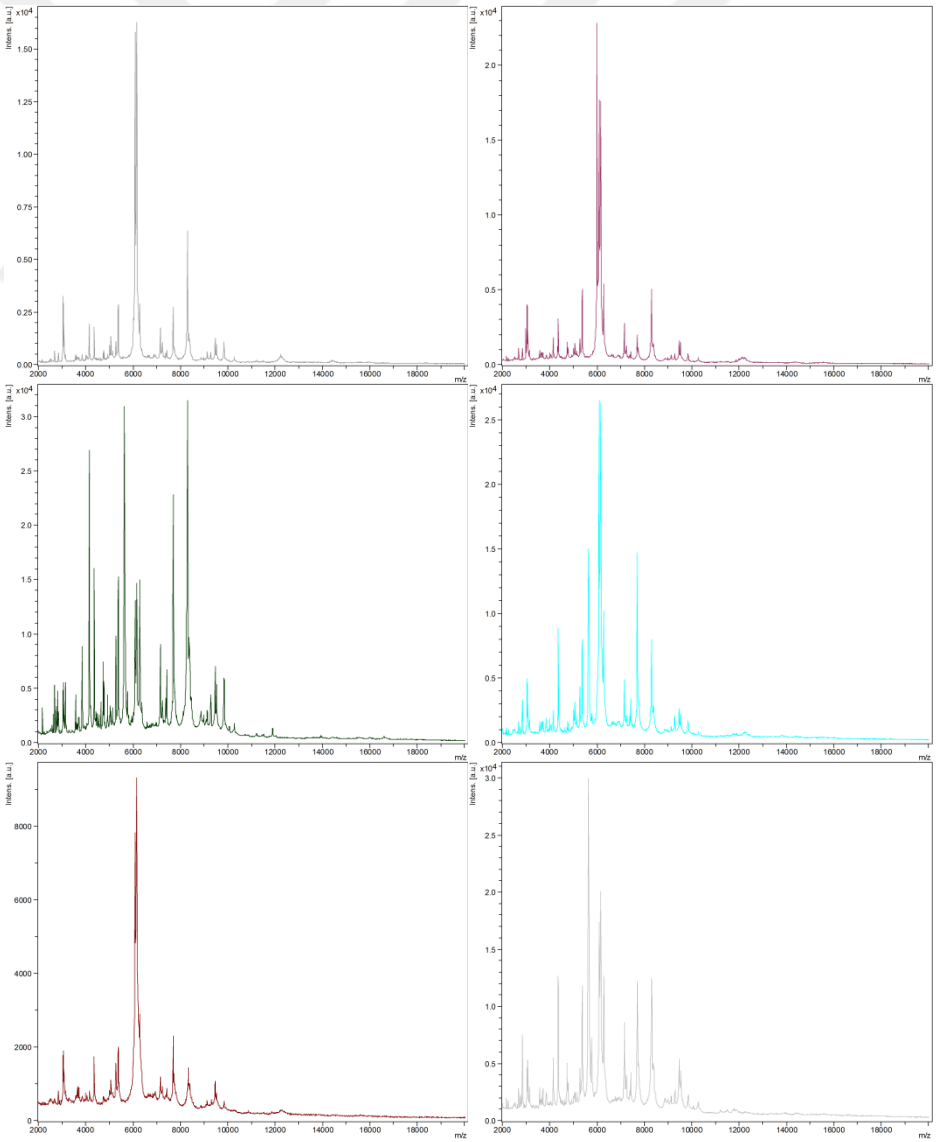
Örnek	**MHB Dilüsyon**		**Gradiyent E-Test**		**Disk Difüzyon**	
	MİK	**Yorum**	**MİK**	**Yorum**	**Zon Çapı**	**Yorum**
2057	0,25	Du	1,5	Du	15	Du
580	1	Du	1,0	Du	14	Du
1248	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
11673737	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
10644	0,5	Du	1,0	Du	14	Du
3624	0,25	Du	1,5	Du	15	Du
11710134	0,25	Du	1,0	Du	16	Du
902	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
11672218	0,25	Du	1,0	Du	14	Du
2009	1	Du	1,5	Du	15	Du
11711495	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
2014	1	Du	1,5	Du	15	Du
11709068	0,25	Du	1,5	Du	16	Du
11675949	0,25	Du	1,0	Du	14	Du
546	0,25	Du	1,0	Du	14	Du
999	2	Du	16	Di	11	Di
11709177	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
2234	1	Du	1,0	Du	14	Du
2189	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
965	0,5	Du	1,0	Du	15	Du
966	0,25	Du	1,5	Du	14	Du
1882	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
2275	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
1353	0,5	Du	1,0	Du	14	Du
2320	0,5	Du	1,5	Du	14	Du
1033	0,25	Du	1,5	Du	14	Du
11729785	0,25	Du	1,0	Du	18	Du
11709684	0,25	Du	1,5	Du	14	Du
11655460	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
11685657	0,25	Du	1,0	Du	15	Du
11689701	0,25	Du	0,1	Du	14	Du
1922	0,25	Du	1,0	Du	14	Du
E.coli ATCC 25922	1	Du	1,5	Du	15	Du

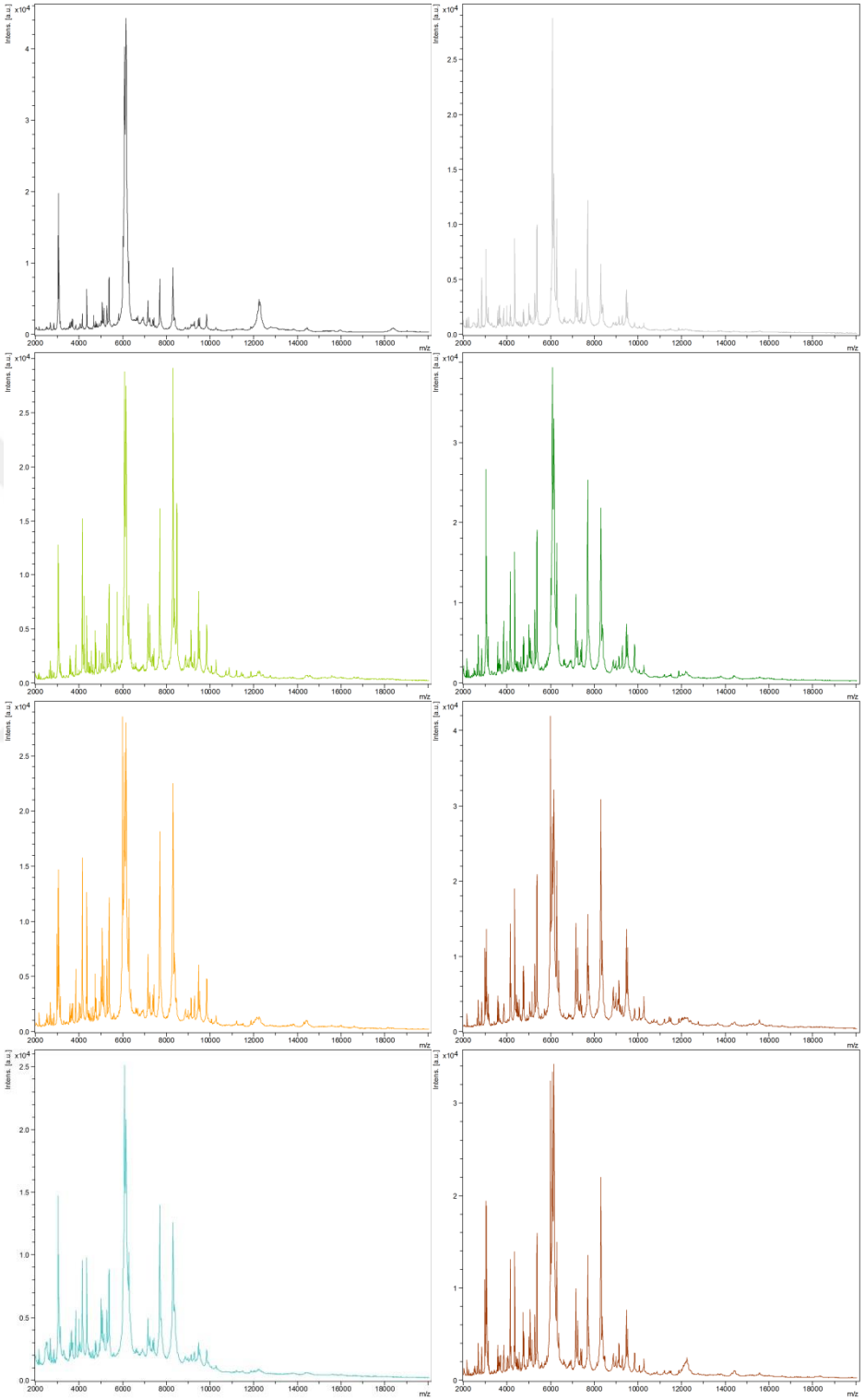
Tablo 6. Sıvı Mikro Dilüsyon Testi ile Karşılaştırıldığında Diğer Fenotipik Testlerin Büyük Hata (BH) ve Çok Büyük Hata (ÇBH) Oranları

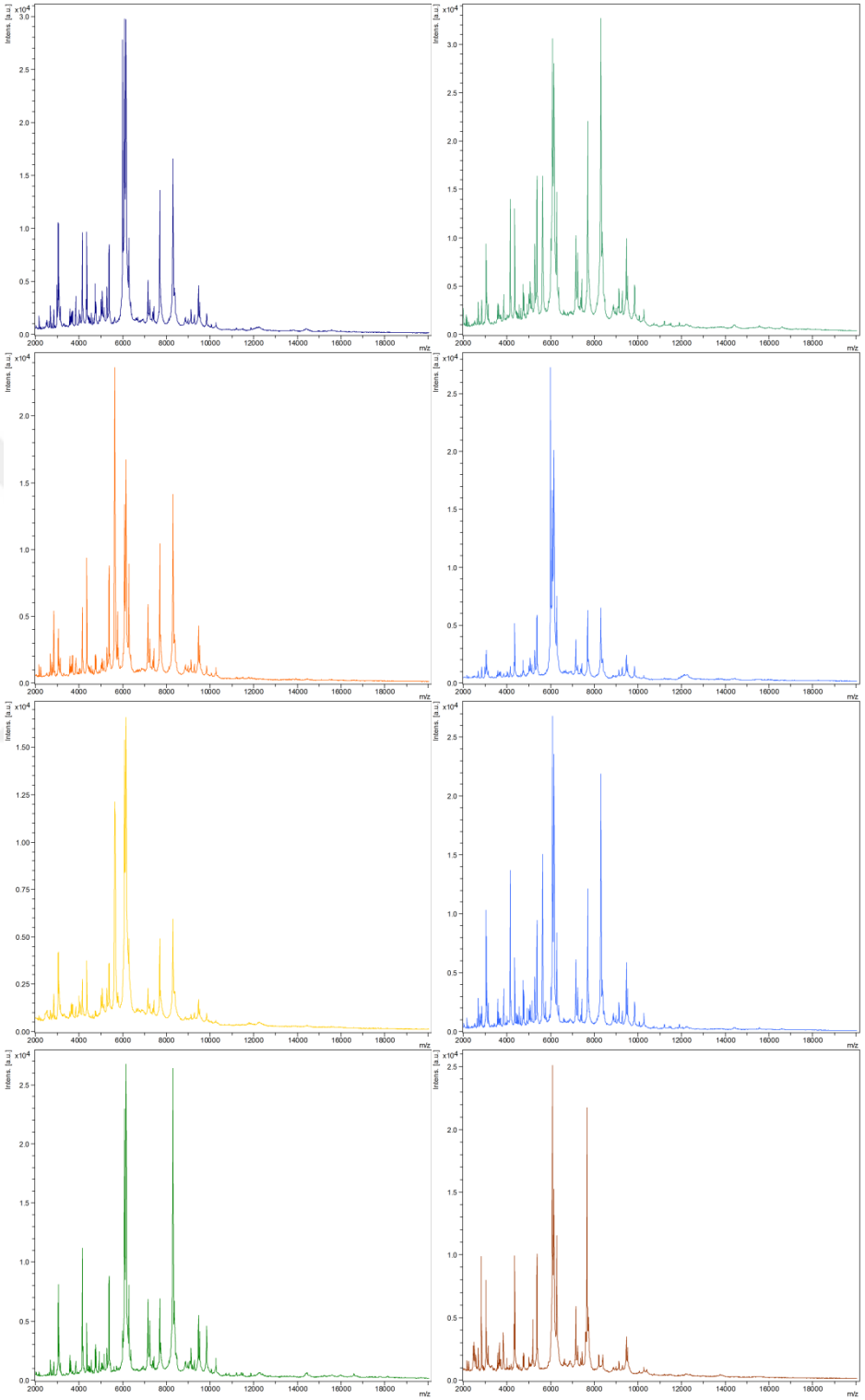
Hata Oranları	Disk Difüzyon (10µg)	Gradiyent Test Strip
BH	% 3,125	% 3,125
ÇBH	% 69,6	% 65,22

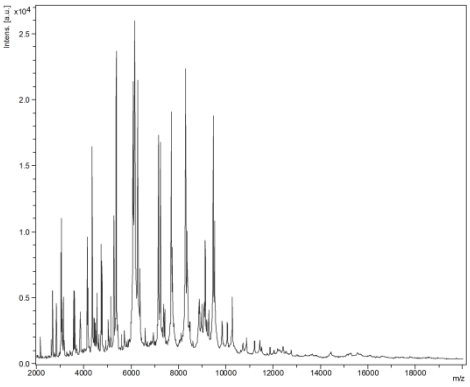
4.2. MALDI-TOF Sonuçları ve MATLAB ile İkili Sınıflandırma Uygulaması

Çalışmaya dahil edilen tüm kökenlerin identifikasyonu MALDI-TOF ile yapılmıştır. Dirençli ve duyarlı *K. pneuomoniae* kökenlerinin ana spektrum profilindeki grafikleri Şekil 1'de, duyarlı *K. pneumoniae* kökenlerinin ana spektrum profilindeki grafikleri Şekil 2'de gösterilmiştir.

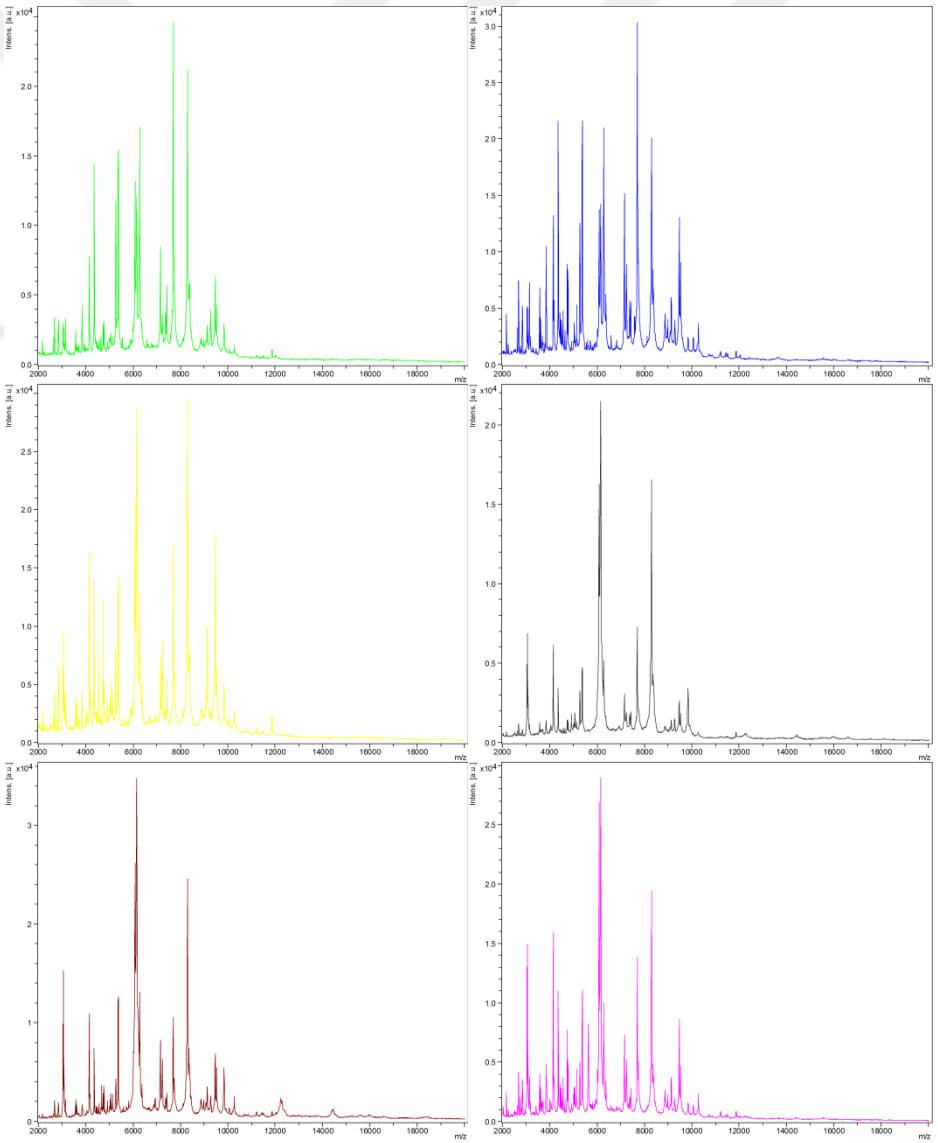


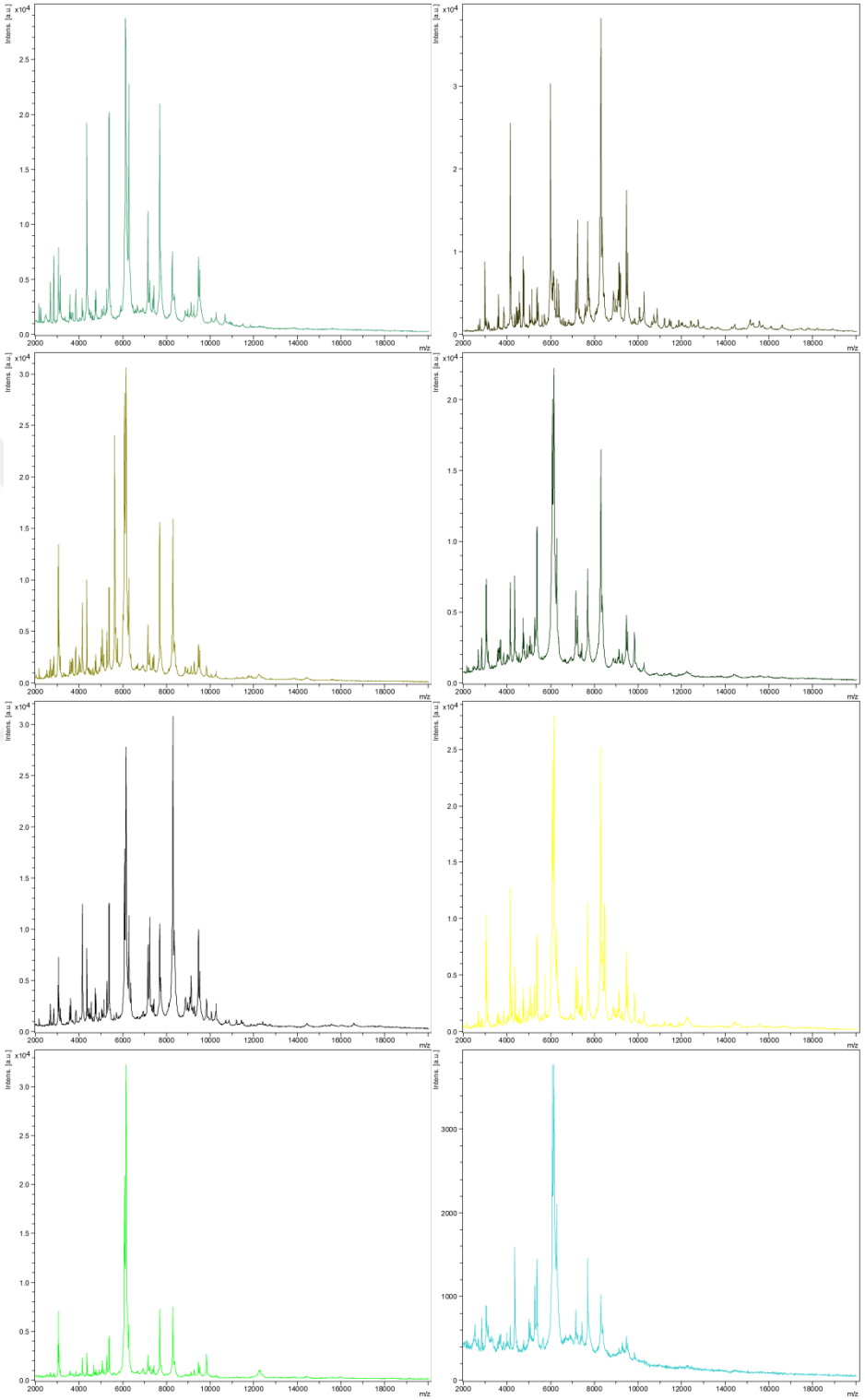

Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

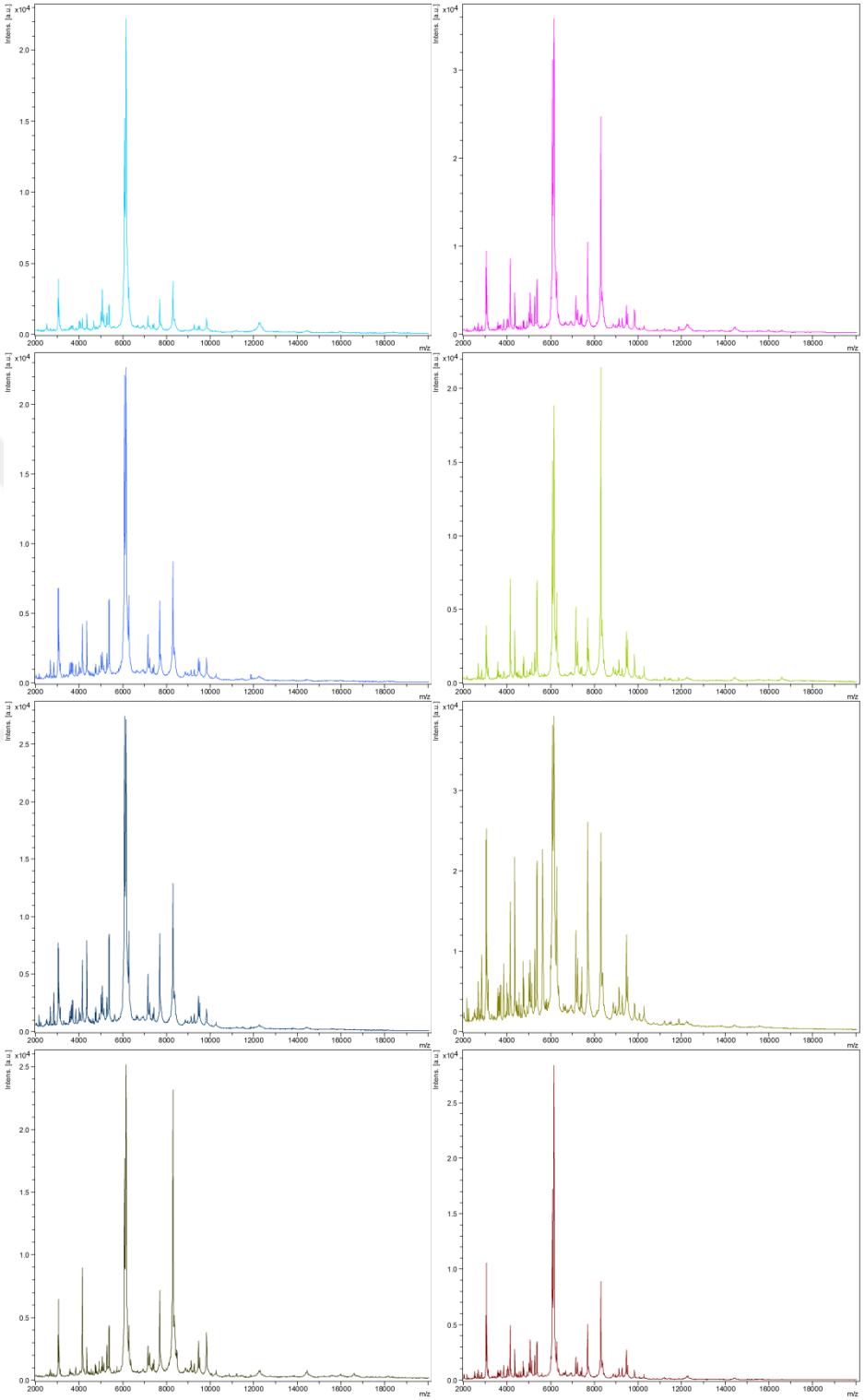

Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

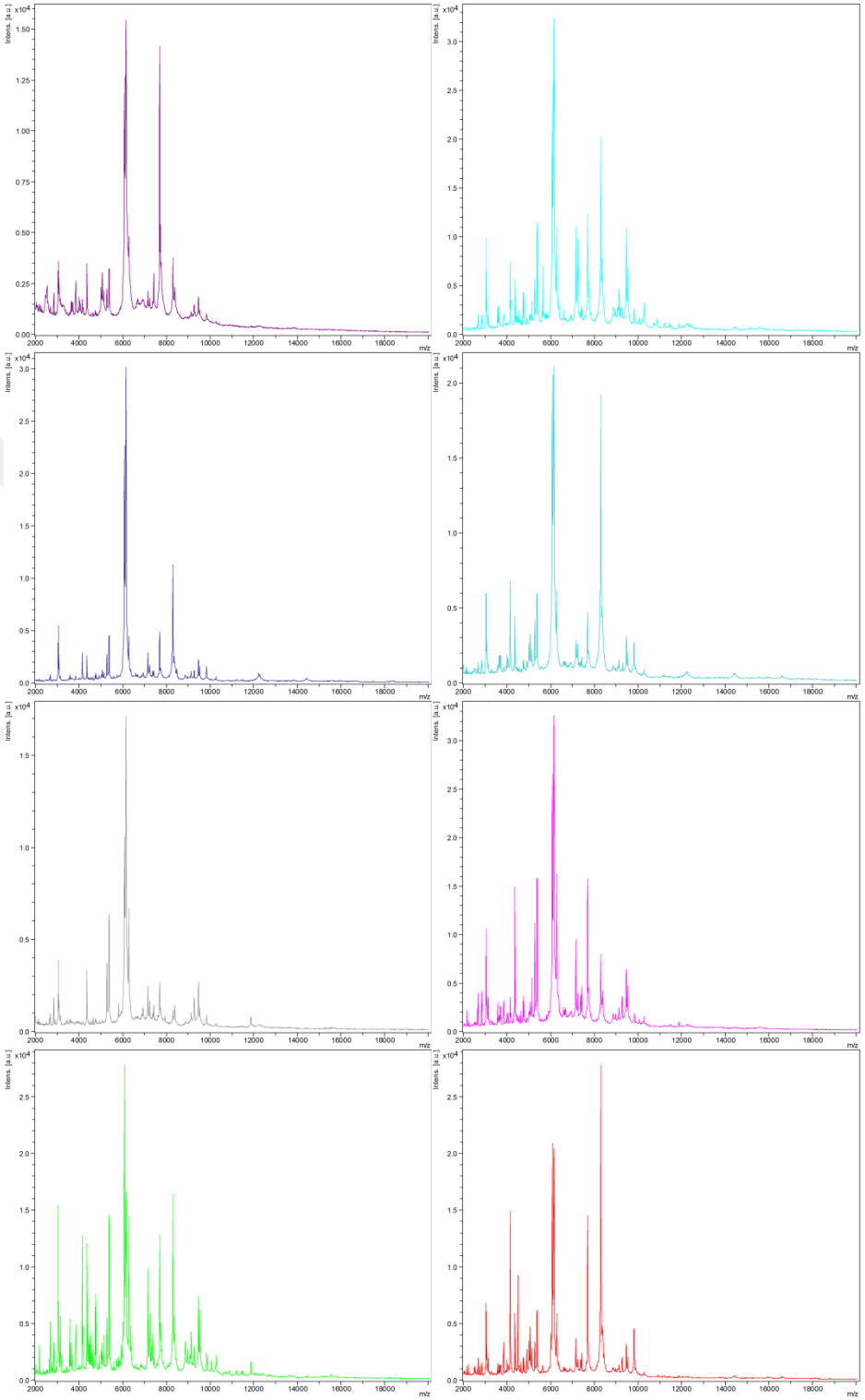


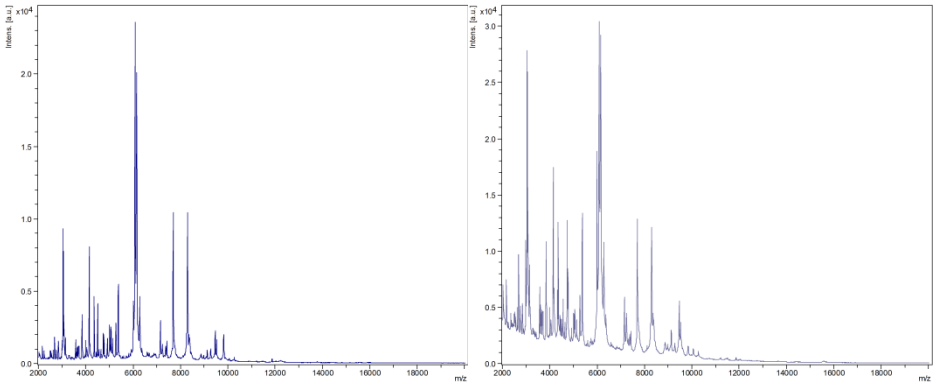
Şekil 1. Dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinin ana spektrum profili sırası ile örnek numaraları 30, 365, 564, 652, 661, 1027, 1264, 1799, 2015, 2116, 2182, 2285, 2288, 2533, 2692, 2985-84, 3011, 3080, 3249, 4484, 5013, 5534, 12397.




Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000


Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000


Intens. [a.u.]
x10^4
m/z
2000
4000
6000
8000
10000
12000
14000
16000
18000

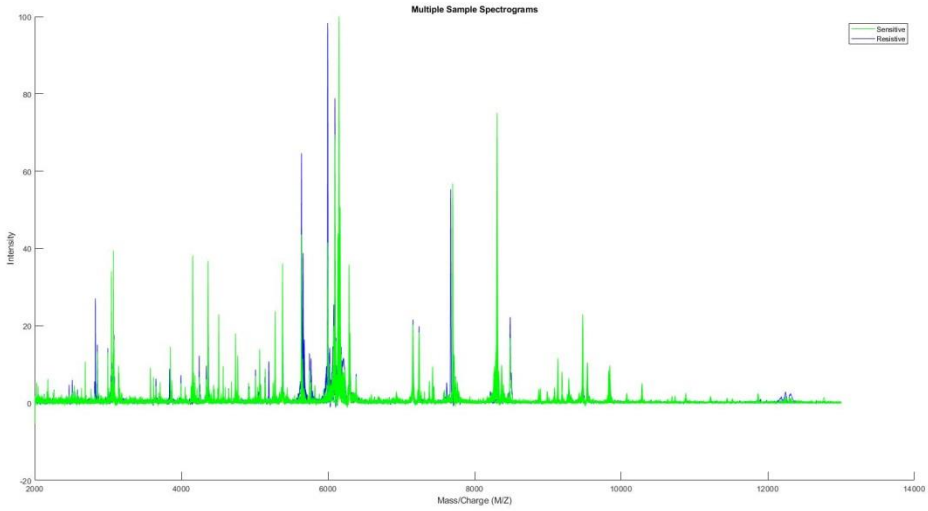


Şekil 2. Duyarlı *K. pneumoniae* kökenlerinin ana spektrum profili sırası ile örnek numaraları 546, 580, 902, 965, 966, 999, 1033, 1248, 1353, 1882, 1922, 2009, 2014, 2057, 2189, 2234, 2275, 2320, 3624, 10644, 11655460, 11672218, 11673737, 11675949, 11685657, 11689701, 11709068, 11709177, 11709684, 11710134, 11711495, 11729785.

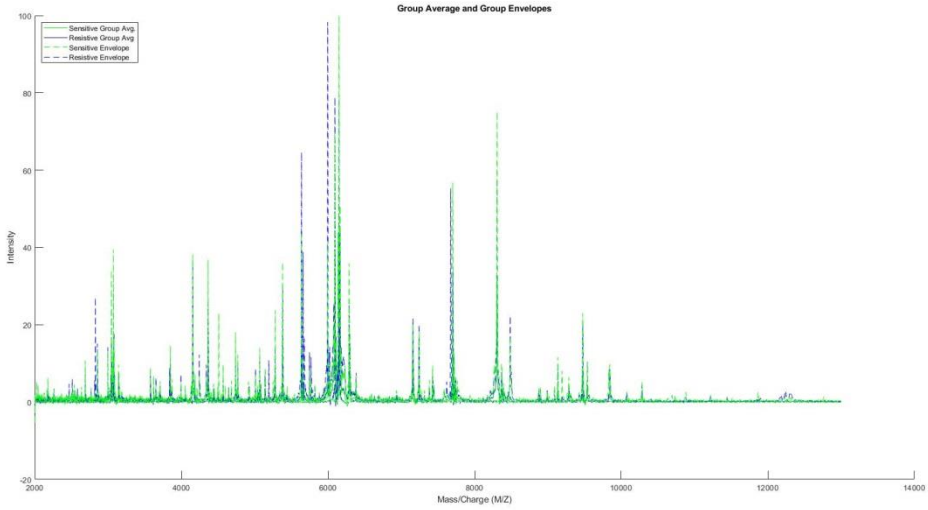
Kökenlerin alınan verilerinin işlenmesi, veri seti oluşturulması, duyarlı ve dirençli kökenlerin ayrıştırılması (ikili sınıflandırma) için makine öğrenimi geliştirilmesinde MATLAB R2018a kullanılmıştır. İlk olarak, dirençli ve duyarlı kökenlerin MALDI-TOF spektrum verilerinden 55x20376 veri seti matriksi oluşturulmuştur. Daha sonra veri ön işlemesi yapılmış, spektroskopi verilerinden yüksek frekanslı gürültü verileri çıkartılarak 1) eğitilecek modelin gürültü verileri dolayısıyla aşırı öğrenmesi önlenmiş, 2) veri setinin boyutu küçültülerek hesaplama zamanı azaltılmıştır. Ön işleme zamanı için anlamlı verinin olmadığı 13000 – 20376 bandındaki spektrum değerleri çıkartılmış ve 2000 – 13000 bandı yeniden örneklendirilmiştir.

Farklı spektrum verileri üzerinde referans düzeltilmesi (baseline correction) yapılarak bütün spektrum verileri ortak bir düşük frekanslı referansa (low frequency baseline) getirilmiştir. Bu yüzden, kökenlerin spektrum verileri üzerinde yeniden örneklendirme yapılmış ve anlamlı örtüşmelere sahip olan 2000 – 13000 spektrum aralığından 20376 öznitelik alınmıştır. Ayrıca, kökenler en yüksek spektrum yoğunluğu kullanılarak normalize edilmiştir. 2000 – 13000 bandındaki 20376 öznitelik kullanılarak makine öğrenimi modeli eğitimi uzun süre alacağından ayrıt edici öznitelik seçimi yapılmasına karar verilmiştir. Öznitelik seçimi ile beraber ayırt edici öznitelikler bulunarak daha az sayıda öznitelik ile makine eğitimi hedeflenmektedir. Bu şekilde, aşırı öğrenme önlenerek daha güvenilir modeller elde edilmektedir. Aynı zamanda, öznitelik sayısı az olduğundan hesaplama süresi daha kısa olmaktadır. (Ladha & Deepa,

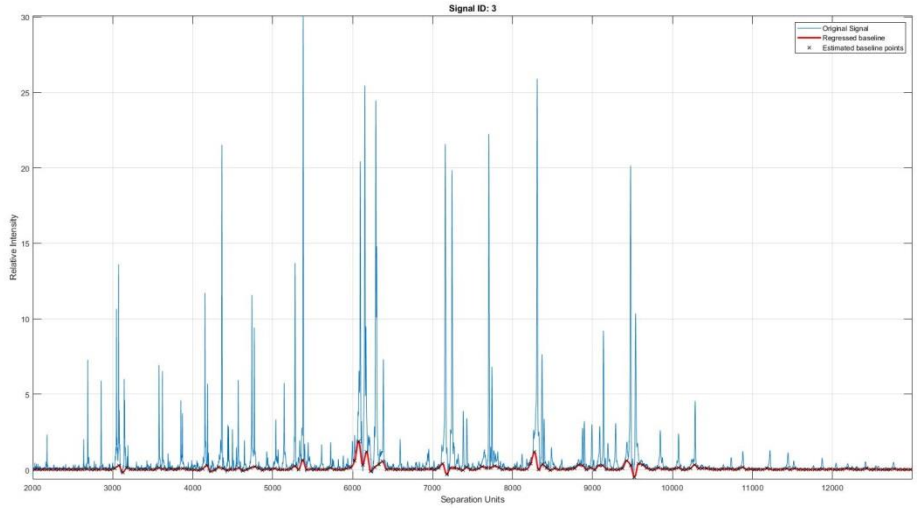
2011) (Khalid, Khalil, & Nasreen, 2014) Öznitelik seçimi için genetik algoritma kullanılmasına karar verilmiştir ve hedef öznitelik sayısı 12 seçilmiştir.



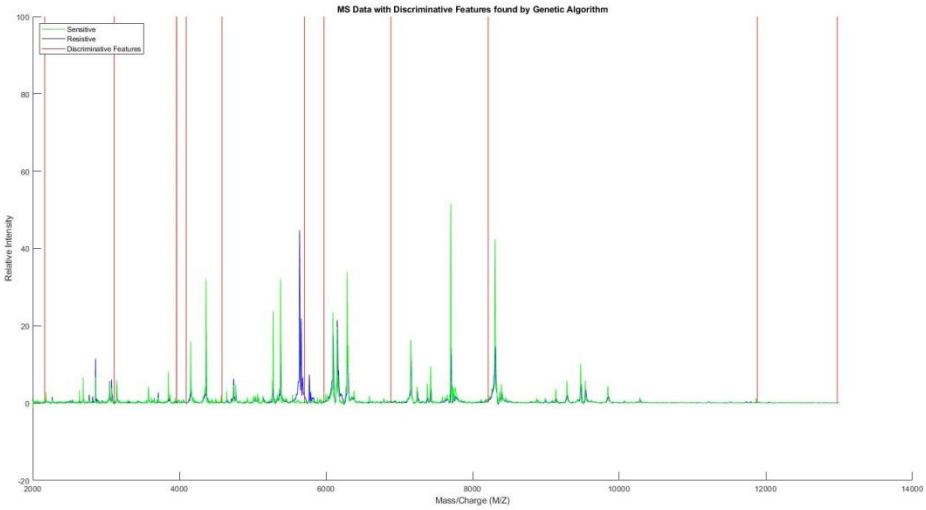
Şekil 3. Tüm verilerin 2000 – 13000 spektrum aralığı



Şekil 4. Dirençli ve duyarlı kökenlerin ortalamaları



Şekil 5. Tüm örneklerin temel düzeltmeler sonucunda elde edilen tahmini başlangıç noktaları



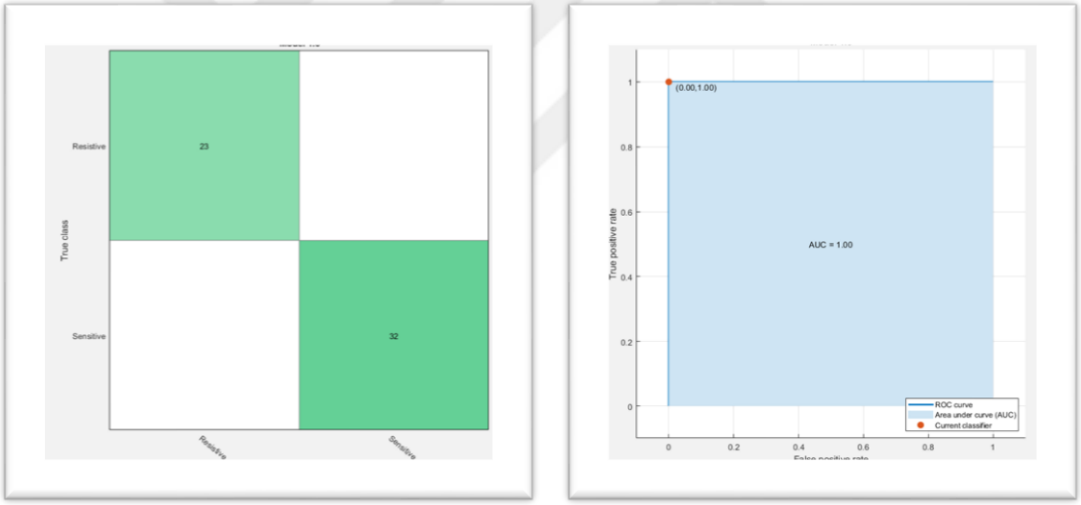
Şekil 6. Genetik algoritma ile belirlenen 12 öznitelik

55 örnek için genetik algoritma ile belirlenen 12 öznitelikten oluşan 55x12 veri seti kullanılarak makine öğrenimi modelleri eğitilmiş ve doğruluğu en yüksek model belirlenmiştir.

Tablo 7. Farklı Makine Öğrenim Modellerinin Doğruluk Oranları

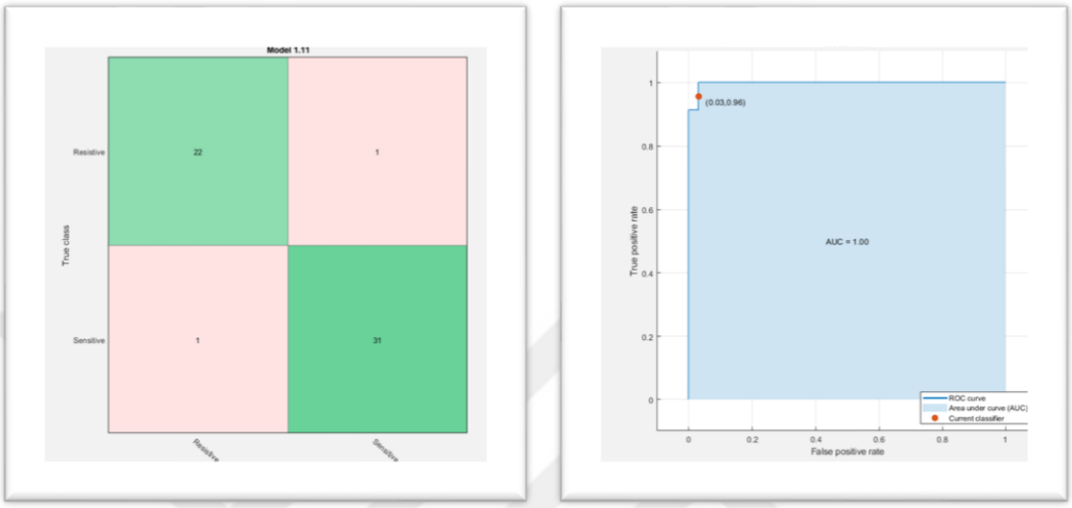
Model	Kernel Fonksiyonu	Doğruluk (%)
Karar Ağacı (Decision Tree)	-	52.7
SVM	Doğrusal	100
SVM	Gauss	96.4
Doğrusal Diskriminant	-	98.2

Doğruluk oranı en yüksek olan Doğrusal SVM modeli makine öğrenim modeli olarak seçilmiştir. Elde edilen hata matriksi ve ROC grafiği (Fawcett, 2004) Şekil 7'de gösterilmiştir.

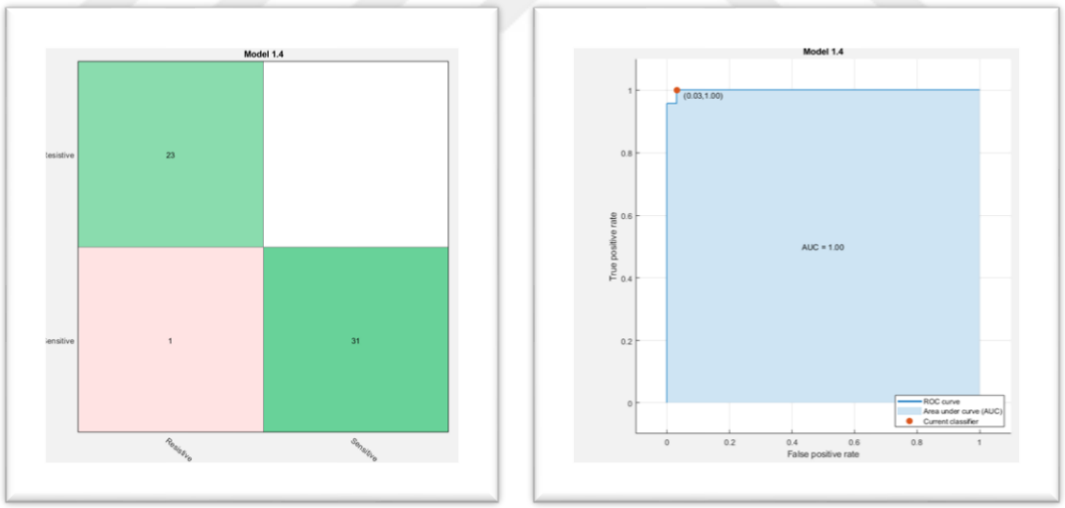


Şekil 7. Doğrusal SVM (%100) modeli makine öğrenim modeli için hata matriksi ve ROC grafiği

Doğruluk oranı olarak yüksek yüzdelere sahip olan Gauss SVM (%96.4) ve Doğrusal Diskriminant (%98.2) modellerinin hata matriksi ve ROC grafikleri Şekil 8 ve Şekil 9'da gösterildiği gibi elde edilmiştir.



Şekil 8. Gauss SVM (%96.4) modeli için hata matriksi ve ROC grafiği



Şekil 9. Doğrusal Diskriminant (%98.2) modeli için hata matriksi ve ROC grafiği

5. TARTIŞMA

Antibiyotik direnci günümüz tıbbının en önemli sorunlarından biridir. 1970'li yıllarda keşfedilen ve kullanıma sokulan birçok yeni antibiyotik enfeksiyon hastalıklarının önemini dramatik olarak düşürüleceğini öngörmüştü. Bu öngörü bakterilerin antibiyotiklere hızla direnç kazanmasıyla maalesef gerçekleşmemiştir. DSÖ projeksiyonlarına göre 2050 yılında mikrobik hastalıklara bağlı ölümlerin yüzde 500 artması öngörülmektedir. Bunun yanısıra çok uluslu büyük ilaç firmalarının antibiyotik geliştirme istekleri de azalmaktadır çünkü yeni antibiyotik keşfi oldukça zahmetli, çok para isteyen ve sonunda geliştirdiğiniz ilaca karşı direnç gelişmesi kaçınılmaz bir süreçtir. İlaç firmaları bu yüzden hipertansiyon, depresyon gibi hem kronik hem de geliştirilmiş müstahzarlara karşı direnç gelişiminin olmadığı dallara ilgi göstermektedir. Örneğin, bir antibiyotik tedavisi yaklaşık bir hafta sürerken, hipertansiyon tedavisi ömür boyu olmaktadır. Ticari birer firma olan ilaç endüstrisi de bu yüzden yeni antimikrobiyal gelişimiyle ilgilenmemektedir. Son yıllarda kullanıma girmiş yeni antibiyotik sınıfı hemen hemen bulunmamaktadır. Bütün bu bilgilerin ışığı altında elimizde ciddi gram-negatif enfeksiyonlarda kullanabileceğimiz kolistin, fosfomisin, sulbaktam vb. antibiyotiklerden optimal düzeyde fayda sağlanmalıdır. (World Health Organization, 2017)

2018'deki Avrupa Antimikrobiyal Direnç Gözetleme Ağı'na (EARS-Net) rapor edilen antimikrobiyal direnç verilerine göre 2014-2017 yılları için 30 Avrupa Birliği ve Avrupa Ekonomik Bölgesi ülkeleri tarafından sunulan sonuçlar, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* için, birkaç antimikrobiyal gruba kombine direnç ve geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimin yaygınlığını göstermektedir. Direnç yüzdelerinin, *K. pneumoniae*'de genellikle *E. coli*'den daha yüksek olduğu kaydedilmiştir. *E. coli* için, üçüncü nesil sefalosporin direnci AB/AEB nüfus ağırlıklı ortalama yüzdeleri, 2014'te %14.2'den 2017'de %14.9'a dört yıl boyunca sürekli raporlama yapılarak sadece laboratuvarlarda elde edilen veriler sonucundaki önemli olan bir artışın söz konusu olduğu görülmüştür. Bunun yanında, *K. pneumoniae* AB/AEB popülasyon ağırlıklı ortalama direnç yüzdeleri, dört yıllık bir süre boyunca sürekli olarak veri rapor eden laboratuvarlara yapılan analizlerde ise önemli bir eğilim kaydedilmemiştir. *E. coli*'de karbapenem direnci nadir kalırken, bazı ülkeler *K.*

pneumoniae için karbapenem direnci yüzdelerinin % 10'un üzerinde olduğunu bildirmiştir. (European Centre for Disease Prevention and Control, 2014-2017)

Türkiye karbapenem direncinin en üst düzeylerde olduğu ülkelerden biri olmasına karşın kolistin direncinin araştırmasının yapıldığı fazla bir çalışma bulunmamaktadır. Yapılan en kapsamlı çalışmalar arasında yer alan Ergönül ve arkadaşları, kan kültürlerinden izole edilen *K. pneumoniae* kökenlerinde kolistin direnç oranını %6 olarak tespit etmişlerdir. (Ergönül, et al., 2016)

Son yıllarda karbapenem dirençli gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar sonucunda kolistin kullanımı artış göstermektedir. Kolistin direncinin saptama yöntemleri önemli bir konu olarak karşımıza çıkmaktadır. Antimikrobiyal direnç tespiti için genellikle disk difüzyon, MİK belirlenmesi gereken durumlarda ise gradiyent şerit testleri kullanılmaktadır. Kolistin gibi önemli bir antibiyotiğin duyarlılığı söz konusu olduğunda, bu yöntemlerin tamamının güvenilirliği tartışmalıdır. Özellikle disk difüzyon testinin kolistin duyarlılığını belirlemede uygun olmadığı, gradiyent şerit yönteminin ise yüksek oranda hatalı sonuçlar verebildiği ortaya konmuştur. Dafopoulou ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *K. pneumoniae* kökenleri için gradiyent şerit yönteminin büyük hata oranını %2,4 çok büyük hata oranını ise %41,5 olarak tespit etmişlerdir. (Dafopoulou, et al., 2015) Dafopoulou ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile benzerlik gösteren Chew ve arkadaşlarının çalışmasında, gradiyent şerit yönteminin büyük hata oranını %5,9 çok büyük hata oranını ise %12 olarak belirlemişlerdir. (Chew, La, Lin, & Teo, 2017) Bu verilere bakılması dışında EUCAST ve CLSI gibi antimikrobiyal duyarlılık testlerinin standardizasyonunda takip edilen kurumlara bakıldığında kolistin duyarlılığının sıvı dilüsyon testi ile belirlenmesi gerektiğini belirtmişlerdir. (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019) (Clinical Laboratory Standarts Institute, 2013)

Bu tez çalışmasında kullanılan fenotipik testler ile aldığımız sonuçlara göre sıvı mikro dilüsyon altın standart olarak kabul edildiğinde ona en yakın değerleri vermesini düşündüğümüz gradiyent şerit test sonuçları beklediğimiz sonuçtan daha yüksek bir hata payına sahip olarak bulunmuştur. E-test sonuçlarında çok büyük hata (dirençli olan bir kökenin duyarlı bulunması) oranı %65,22 olarak belirlenmiştir. Bir diğer fenotipik duyarlılık testi olan disk difüzyon testi sonuçlarındaki çok büyük hata oranı ise %69,6 olarak bulunmuştur. Disk difüzyon ve E-test için büyük hata (duyarlı olan bir kökenin

dirençli bulunması) oranı ise her iki test içinde %3,125 olarak bulunmuştur. Elde ettiğimiz bu veriler doğrultusunda rutin laboratuvarda direncin saptanmasında büyük rol oynayan bu iki duyarlılık testinin ÇBH ve BH oranlarının bu derece fazla olması sebebi ile gram-negatif bakteriler ve özellikle *K. pneumoniae*'nin kolistin direncinin saptanmasında güvenilirliği oldukça düşük bulunmuştur. Bu hata oranları göz önünde bulundurularak çoklu ilaca dirençli gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde önemli bir yere sahip olan kolistine duyarlılığın diğer yöntemlere oranla daha zor uygulanan bir prosedüre sahip olsa da bu hususta belirleyici olarak sıvı dilüsyonun kullanılması gerektiği görülmektedir.

Önceden veya yakın zaman içerisinde antibiyotik kullanımı, ileri yaş, yoğun bakımda yatma hikayesi, vücutta yabancı cisim varlığı, kök hücre transplantasyonu ve bu bakterilerin endemik olduğu ülkelerde sağlık hizmeti almış olmak çoklu ilaca dirençli gram-negatif bakteriler ile enfekte olan hastalarda saptanan risk faktörleri arasında bulunmaktadır. (Vasoo, Barreto, & Tosh, 2015) Türkiye'de yapılan geniş katılımlı bir araştırmada, son üç ayda antibiyotik kullanımının yanı sıra kolistin, karbapenem veya kinolon kullanımının da kolistin dirençli gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksyon riskini anlamlı derecede arttırdığı belirlenmiştir. Bunlar dışında hastanede yatış süresi ve yoğun bakımda yatma hikayesinin de kolistin direnci ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. (Yilmaz, et al., 2016)

Antibiyotiklerin insanlarda kontrolsüz kullanımı, dirençli bakterilerin ortaya çıkmasını kaçınılmaz hale getirmektedir. Antibiyotik direnci ile mücadele, antibiyotikleri reçete eden doktorlar, araştırmacılar ile uluslararası seviyede tartışılması gereken bir konu olarak değerlendirilmektedir. Bir antibiyotiğin aşırı kullanımının ardından bakterilerin bu tehdite karşı direnç geliştirmesi kaçınılmaz bir sonuç olmaktadır. Sağlık çalışanları, hasta ve hasta yakınlarının antibiyotik kullanımı ile ilgili kişisel kararları toplumsal bir bakış açısından uzak olabilmekle beraber, ortaya çıkan aşırı tüketim antinimikrobiyal direnç gelişmesine neden olmaktadır. (World Health Organization, 2017)

Antibiyotik kullanımının kısıtlanması ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin enfeksiyon hastalıkları hekiminin onayı ile kullanılması, hem antibiyotik harcamalarında hem de direnç oranlarında azalmaya neden olmaktadır. (Arda, et al., 2007) (Azap, et al., 2005) Ülkemizde yapılan bazı çalışmalar sonucunda bilinçlenen

toplum ile kısıtlama politikası kullanılan antibiyotik miktarlarındaki azalmayı ve direnç oranlarındaki düşmeyi açık olarak desteklemektedir. (Du, Chen, Tang, & Kreiswirth, 2016)

Antibiyotik direncinin saptanması klinik mikrobiyolojik tanının ayırt edici özelliklerindendir. Saptanma aşaması zaman alıcı olsa da, antibiyotik direnci testi için altın standart olarak kültüre dayalı yöntemler hala dünya çapında tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. MALDI-TOF MS'nin tıbbi mikrobiyolojiye girişi ile bakteri ve mantarları hızlı tanımlanmasına sağlanan katkı büyük bir ilerleme sağlamıştır. Şimdilerde, antibiyotik ve antimikotik direncin hızlı saptanabilirliği için MALDI-TOF MS'den yararlanmak için çalışmalar ve doğruluğunun diğer tanı testleriyle karşılaştırmaları sonucunda klasik yöntemlerin yerini alabileceği düşünülmektedir. (Kostrzewa, Sparbier, Maier, & Schubert, 2013)

MALDI-TOF MS'in direnç tespiti potansiyelini araştırmak için yapılan çalışmalara bakıldığında; Manchester Üniversitesi'nden bir grup tarafından yapılan çalışmada *S. aureus*'u MRSA ve MSSA'da ayırma çalışmaları yapılmıştır. Yedi MSSA suşunun MALDI-TOF kütle spektrumlarını, PFGE ve geleneksel faj tiplemesi ile yedi MRSA hastane izolatını ve kütle aralığında altı farklı koagülaz negatif *Stafilokok* türünü 10 000 m/z'ye analiz etmişlerdir. Çoğu izolatın piklerinin 500-2000 m/z aralığında bulunduğu belirli izolat için parmak izi olarak kabul edilmiştir. MSSA suşları az sayıda pik (37–67) ve MRSA suşları daha fazla (82-209) üreterek pik sayılarının miktarına göre hazır görsel ayrımcılığa izin vermiştir. Koagülaz negatif *Stafilakok* spekturumları türler arasında farklılık göstermiştir. Ön sonuçlardan, görsel ayrımcılığın mümkün olduğu görülmüştür. (Edwards-Jones, Claydon, Evason, Walker, Fox, & Gordon, 2000)

Manchester Üniversitesi'nden başka bir grubun gerçekleştirdiği daha ileri çalışmada, MRSA'nın tanımlanması ve alt tipi için kültür ortamının laboratuvar içi ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliğinin etkilerini araştırmışlardır. Yirmi altı *Stafilokok* izolatı, 14 MRSA, 6 MSSA ve 6 Koalügaz negatif *Stafilakok* çalışmaya dahil edilmiştir. Farklı yetiştirme ortamları kullanılarak inkübasyon yapıldıktan sonra yetiştirme ortamına özgü farklı kütle pikleri veren kütle spektrumları elde edilmiştir. Bu tür ortamdan elde edilen spektrumlara bakılarak 500-2000 m/z aralığındadır. (Walker, Fox, Edwards-Jones, & Gordon, 2002)

Giordano ve ark. 2018 yılında yapmış oldukları bir araştırmada, MALDI-TOF teknolojisinde ClinProtTools v3.0 yazılımı tarafından üç standart algoritma kullanarak *Klebsiella pneumoniae* suşlarını otomatik olarak kolistin dirençli veya kolistin duyarlı olarak sınıflandırabilecekleri bir veritabanı girişi oluşturarak kolistine dirençli suşların %71 oranında doğru sınıflandırıldığı bir sonuç elde etmişlerdir. Yazılım ile elde edilen tepe noktalarının görsel olarak karşılaştırılmasıyla veya ticari yazılım ürünlerini kullanarak biyolojik-matematiksel akıl yürütme kombinasyonunun kullanılmasıyla sonuca ulaşılabilir olduğu düşünülmüştür. Sınıflandırma modelinin güvenilir olarak oluşturulması için alınan verilerin en yüksek özelliğe sahip algoritma kullanılmıştır. Elde ettikleri veriler doğrultusunda ana spektrum profilindeki değişiklikler, 4507,28 Da ve 5142,84 Da'da kolistin duyarlı ve kolistin dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşları arasındaki yoğunlukları gösterdiği öngörüsünü savunmuşlardır. Bilgiler doğrultusunda 4507,28 Da'da pik yoğunluğu kolistine duyarlı izolatlar arasında, 5142,84 Da'da pik yoğunluğu kolistin dirençli izolatlar arasında daha yüksek olduğu sonucuna varmışlardır ve kolistine dirençli *Klebsiella pneumoniae*'nın gerçek zamanlı olarak basit ve hızlı bir şekilde sınıflandırılmasını sağlayan, aynı zamanda çoklu ilaca dirençli patojenler için enfeksiyon kontrol önlemlerini hızlandıran araştırma yöntemleri arasında MALDI-TOF'un bu yazılım ve algoritmasının kullanılabileceğini verileri ile elde etmişlerdir. (Giordano & Barnini, 2018)

Bu tez çalışmasında kökenlerin MALDI-TOF incelenmesinde elde edilen ana spektrum profilinde yapılan inceleme sonucunda dirençli ve duyarlı kökenler arasında fark bulunamamıştır. Kullanmış olduğumuz MALDI-TOF cihazında ek yazılım bulunmaması sebebi ile gerekli algoritma sağlanamamaktadır. Sonuçların MALDI-TOF cihazında bulunan bir yazılım ile gerçekleştirmek mümkün olmamıştır. Bilgisayar programlama dillerinden olan MATLAB ile ikili sınıflandırma için Makine öğrenimi modeli geliştirilmiştir. Sınıflandırma Uygulamasını kullarak elde ettiğimiz spektrum verilerini değerlendirerek kolistin duyarlı ve dirençli kökenlerin MALDI-TOF ile saptanması amaçlanmıştır. MATLAB R2018a kullanarak oluşturduğumuz genetik algoritma ve makine öğrenimi modeli ile kolistine dirençli ve duyarlı suşların ayrımı sağlanabilmektedir. Bu elde edilen sonuçların doğrulukları kontrol edildiğinde ise yüksek doğruluk yüzdeleri elde edilmiştir. Bu sistemin olumlu sonuçlar vermesi ile birçok dirençli suş için makine öğrenimi modelinin hızlı tespitte katkı sağlayabileceği ve hatta geliştirilebileceği görülmektedir.

Kolistin günümüzde gıda hayvancılığında hayvanlara yemlerine karıştırılarak verilmeye devam etmektedir. Kuşkusuz antibiyotikleri tehdit eden bir başka unsur ise insanlarda kullanımlarının yanısıra gıda hayvancılığında verimi arttırmak amacıyla kullanılmalarıdır. Son seçenek olarak kullanılan antibiyotiklerin bu kadar yaygın bir şekilde kullanılmaları inanılmaz olmakla beraber elimizde ciddi gram-negatif enfeksiyonlar için seçenek neredeyse bulunmamaktadır.

Enfeksiyon kontrolünün yapılması ile antibiyotik direncinin önüne geçilerek antimikrobiyal direnç konusunda mücadele gösterilirken, günümüzde yapılan çalışmalar ve geliştirilecek ilaçlar ile çoklu antibiyotik direnci olan bakterilere çözüm olabilecek yeni kuşak antibiyotiklerin daha düzenli olarak kullanılması sonucunda gelecek nesillere dirençli suşlar ile savaş konusunda yardımcı olunabilmektedir.

MALDI-TOF tüm mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizma tanımlama kurallarını baştan sona değiştirmiştir. Özellikle bakteri ve mantarlar başta olmak üzere mikroorganizmaların tanımlanmasında süre dakikalar düzeyine inmiştir. Ayrıca ilk yatırımdan sonra cihazın mikroorganizma için adet başına maliyetlerinin oldukça düşük olması en önemli avantajlarından olmaktadır. Bu alet sayesinde bakteriyoloji ve mikoloji laboratuvarlarında mikroorganizma tanımlama işi oldukçe yavaş olmaktan çıkmıştır ve bu dallara bir hız getirdiği açıktır. Neredeyse Koch ve Pasteur zamanından kalma besiyerleri ile identifikasyon oldukça zahmetli, teknik bilgi isteyen ve en önemlisi zaman alıcı konvansiyonel yöntemlerdir. Bu konvansiyonel yöntemlerin hayatı tehdit eden enfeksiyon hastalıklkarına neden olan mikroorganizmaları ivedilikle tanımamıza ve daha ötesi yakın da daha ayrıntılı incelemelerle bize direnç özellikleri ile ilgili bilgi vermesi kaçınılmazdır. Neredeyse tüm laboratuvar, görüntüleme sistemlerindeki ileri gidiş bakteriyoloji ve mikoloji laboratuvarlarında da kendini en sonunda hissettirmiştir. Bu gelişmeler doğrultusunda hastalıklara ve hastalara yaklaşım ve tedavi dışında yapılacak olan akademik çalışmalarda da MALDI-TOF'un büyük katkısı olacaktır.

Enfeksiyon hastalıklarının beklendiği gibi gelecekte insanları ciddi derecede etkileyici bir mekanizmaya sahip olup olmadıkları bu hususta dikkat edilmesi gereken noktalara gereken özeni göstererek, dikkat ederek, gelecekte enfeksiyon hastalıklarının görülme olasığının azalmasına önemli ölçüde katkı sağlayacaktır. Önümüzde maalesef

antibiyotikler açısından ortaçağa dönmek gibi bir kabus bulunmaktadır, umarız bütün bunlar bir şekilde tüm sağlık unsurlarının biraraya gelmesi ile çözülür.

KAYNAKLAR

Abbott, S. (2009). Enterobacteriaceae. P. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Landry, & M. Pfaller içinde, *Temel ve Tıbbi Mikrobiyoloji* (s. 55 - 56). Ankara: Atlas Kitapçılık.

Arda, B., Sipahi, O., Yamazhan, T., Tasbakan, M., Pullukcu, H., Tunger, A., et al. (2007). Short-term effect of antibiotic control policy on the usage patterns and cost of antimicrobials, mortality, nosocomial infection rates and antibacterial resistance. *J Infect*, 55(1):41-48.

Azap, A., Topçuoğlu, P., Yeşilkaya, A., Arat, M., Memikoğlu, O., Akan, Ö., et al. (2005). The effect of a nationwide antibiotic restriction policy on antibiotic usage in a stem cell transplantation unit. *Turk J Haematol*, 22(2):87-90.

Baçıkçan, M. (2004). Yersinia - Klebsiella-Enterobacter ve Proteus. T. Cengiz, A. Mısırlıgil, & M. Aydın içinde, *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji* (s. 475-498). Ankara: Güneş Kitabevi.

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

Bassetti, M., Giacobbe, D., Giamarellou, H., Viscoli, C., Daikos, G., Dimopoulos, G., et al. (2018). Management of KPC-producing Klebsiella pneumoniae infections. *Clin Microbiol Infect.*, 24(2):133-144.

Baysal, B. (2004). Enterobacteriaceae. T. Cengiz, A. Mısırlıgil, & M. Aydın içinde, *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji* (s. 445 - 456). Ankara: Güneş Kitabevi.

Bilgehan, H. (2009). *Klinik Mikrobiyolojik Tanı.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.

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

Boyle, D., & Zembower, T. (2015). Epidemiology and Management of Emerging Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Extended-Spectrum β-Lactamases and Beyond. *Urol Clin North Am*, 42(4):493-505.

Carrër, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Cagatay, A., Badur, S., & Nordmann, P. (2008). Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant Klebsiella pneumoniae Isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(8): 2950-2954.

Carvalhaes, C., Cayô, R., Visconde, M., Barone, T., Frigatto, E., Okamoto, D., et al. (2014). Detection of carbapenemase activity directly from blood culture vials using MALDI-TOF MS: a quick answer for the right decision. *J Antimicrob Chemother*, 69(8):2132-6.

Chew, K., La, M., Lin, R., & Teo, J. (2017). Colistin and Polymyxin B Susceptibility Testing for Carbapenem-Resistant and mcr-Positive Enterobacteriaceae: Comparison of Sensititre, MicroScan, Vitek 2, and Etest with Broth Microdilution. *J Clin Microbiol*, 55(9):2609-2616.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). *M07-A10 Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow Awrobically*. 2019 tarihinde https://clsi.org/media/1632/m07a10_sample.pdf adresinden alındı

Clinical Laboratory Standarts Institute. (2013). *M100-S23 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement*. 2019 tarihinde https://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-M100S23-susceptibility-testing-2013-no-protection.pdf adresinden alındı

Cobo, F. (2013). Application of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Virology: A Review. *Open Virol J.* , 7: 84–90.

Çolak, D. (1999). Antimikrobiyal İlaçlar ve Etki Mekanizmaları. Ş. Ustaçelebi içinde, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji.* Ankara: Güneş Kitabevi.

Dafopoulou, K., Zarkotou, O., Dimitroulia, E., Hadjichristodoulou, C., Gennimata, V., Pournaras, S., et al. (2015). Comparative Evaluation of Colistin Susceptibility Testing Methods among Carbapenem-Nonsusceptible Klebsiella pneumoniae and Acinetobacter baumannii Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(8):4625-30.

Dat, T., Shue, L., & Guan, C. (2006). Electrocorticographic signal classification based on time-frequency decomposition and nonparametric statistical modeling. *28th IEEE EMBS Annual International Conference*, (s. 2292-2295). New York City.

Demiray, T., Aydemir, Ö., Kılıç, Ü., Yılmaz, K., Köroğlu, M., & Altındiş, M. (2017). Karbapenem Dirençli Klebsiella pneumoniae İzolatlarında Karbapenemaz

Saptanmasında Karbapenemaz İnaktivasyon Testinin Kullanımı. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 47(2):78-82.

Doğan, M. (2018). Matriks Aracılı Dezorbsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Sistemlerinin Virolojide Kullanımı. M. Altındiş içinde, *Temel, Klinik ve Tanısal Tıbbi Viroloji* (s. 419-25). İstanbul: Nobel Yayınevi.

Du, H., Chen, L., Tang, Y.-W., & Kreiswirth, B. (2016). Emergence of the mcr-1 colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3):287-288.

Edwards-Jones, V., Claydon, M., Evason, D., Walker, J., Fox, A., & Gordon, D. (2000). Rapid discrimination between methicillin-sensitive and methicillin-resistant Staphylococcus aureus by intact cell mass spectrometry. *J Med Microbiol*, 49(3):295-300.

Emonet, S., Shah, H., Cherkaoui, A., & Schrenzel, J. (2010). Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect*, 16(11):1604-13.

Engelkirk, P., & Duben-Engelkirk, J. (2016). *Burton's Microbiology for the Health Sciences.* İstanbul Tıp Kitabevleri.

Erdem, B. (1999). Enterobacteriaceae. Ş. Ustaçelebi içinde, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (s. 471- 515). Ankara: Güneş Kitabevi.

Ergönül, Ö., Aydin, M., Azap, A., Başaran, S., Tekin, S., Kaya, Ş., et al. (2016). Healthcare-associated Gram-negative bloodstream infections: antibiotic resistance and predictors of mortality. *J Hosp Infect*, 94(4):381-385. .

European Centre for Disease Prevention and Control. (2014-2017). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017*. 2019 tarihinde https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-resistance-europe-2017 adresinden alındı

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2019). *Clinical breakpoint table for bacteria v 9.0*. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/ adresinden alınmıştır

Fawcett, T. (2004). ROC graphs: Notes and practical considerations for researchers. *Machine learning*, 31(1);1-38.

Giordano, C., & Barnini, S. (2018). Rapid detection of colistin-resistant Klebsiella pneumoniae using MALDI-TOF MS peak-based assay. *J Microbiol Methods*, 155:27-33.

Hoppe, S., Bier, F. F., & Nickisch-Rosenegk, M. V. (2014, October 21). Identification of Antigenic Proteins of the Nosocomial Pathogen Klebsiella pneumoniae. *PLoS One*, 9(10):e110703.

Iraz, M., Özad Düzgün, A., Sandallı, C., Doymaz, M., Akkoyunlu, Y., Saral, A., et al. (2015). Distribution of β-lactamase genes among carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains isolated from patients in Turkey. *Ann Lab Med*, 35(6):595-601.

İstanbul Üniversitesi Yayınları. (2011). *Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Ders Kitabı.* İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Yayınları.

Joseph, D., C, Y., C, R., & Moellering, J. (2009). Antibakteriyel Ajanlar. P. Murray, E. Baron, J. Jorgensen, M. Landry, & M. Pfaller içinde, *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji 9. Baskı.* Ankara: Atlas Kitapçılık.

Kahlmeter, G., Brown, D., Goldstein, F., MacGowan, A., Mouton, J., Odenholt, I., et al. (2006). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect.*, 12(6):501-3.

Kahlmeter, G., Brown, D., Goldstein, F., MacGowan, A., Mouton, J., Osterlund, A., et al. (2003). European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 52(2):145-8.

Khalid, S., Khalil, T., & Nasreen, S. (2014). A survey of feature selection and feature extraction techniques in machine learning. *In 2014 Science and Information Conference* (s. 372-378). IEEE.

Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., & Schubert, S. (2013). MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl*, 7(11-12):767-78.

Ladha, L., & Deepa, T. (2011). Feature selection methods and algorithms. *International journal on computer science and engineering*, 3(5);1787-1797.

Maleki, M., Manshouri, N., & Kayikcioglu, T. (2017). Application of PLSR with a comparison of MATLAB classification learner app in using BCI. *25th Signal*

Processing and Communications Applications Conference, (s. 1585-1588). Antalya.

Martin, R., & Bachman, M. (2018). Colonization, Infection, and the Accessory Genome of Klebsiella pneumoniae. *Front Cell Infect Microbiol*, 8(4)-15.

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

Nordmann, P., Naas, T., & Poirel, L. (2011). Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*, 17:1791-98.

Podschun, R., & Ullmann, U. (1998, October). Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Germany: Clinical Microbiology Reviews.

Poirel, L., Özdamar, M., Ocampo-Sosa, A., Türkoglu, S., Ozer, U., & Nordmann, P. (2012). NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae Now in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(5): 2784–2785.

Porreca, A., Sullivan, K., & Gallagher, J. (2018). The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*, 20(6):13.

Procop, G., Church, D., Hall, G., Janda, W., Koneman, E., Schreckenberger, P., et al. (7 th ed. 2017). *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Ankara: Hipokrat Yayınevi.

Štveráková, D., Šedo, O., Benešík, M., Zdráhal, Z., Doškař, J., & Pantůček, R. (2018). Rapid Identification of Intact Staphylococcal Bacteriophages Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Viruses*, 10(4): 176.

T.C. Sağlık Bakanlığı . (2019). *Ulusal Mikrobiyoloji Standartları Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi*. https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/rehberler/UMS_LabTaniRehberi_Cilt_2.pdf adresinden alınmıştır

Töreci, K. (2002). Enterobacteriaceae Genel Özellikleri. A. Willke Topçu, G. Söyletir, & M. Doğanay içinde, *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (s. 1575 - 1586). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

Vasoo, S., Barreto, J., & Tosh, P. (2015). Emerging issues in gram-negative bacterial resistance: an update for the practicing clinician. *Mayo Clin Proc*, 90(3):395-403.

Walker, J., Fox, A., Edwards-Jones, V., & Gordon, D. (2002). Intact cell mass spectrometry (ICMS) used to type methicillin-resistant Staphylococcus aureus: media effects and inter-laboratory reproducibility. *J Microbiol Methods*, 48(2-3):117-26.

World Health Organization. (2017). *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*. 2019 tarihinde http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf adresinden alındı

Yilmaz, G., Dizbay, M., Guven, T., Pullukcu, H., Tasbakan, M., Guzel, O., et al. (2016). Risk factors for infection with colistin-resistant gram-negative microorganisms: a multicenter study. *Ann Saudi Med*, 36(3):216-22.

ETİK KURUL KARARI

İÜC Tarih ve Sayı: 11/02/2019-23426

T.C.
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı :83045809-604.01.02-
Konu :Yüksek Lisans Öğrencisi Seçil İSKENDER'in etik kurul kararı A-45

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

İlgi :16.01.2019 tarih, 64414572-604.01.01-9123 sayılı yazı

Anabilim Dalınız öğretim üyesi **Prof.Dr.Ömer KÜÇÜKBASMACI'nın** danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğrencisi Seçil İSKENDER'in** yürütücülüğünde **"Klebsiella Pneumomoniae Kökenlerinde Kolistin Direncinin Çeşitli Yöntemlerle İncelenmesi ve Direncin MALDİ-TOF Yöntemiyle Hızlı Saptanması"** başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında ilgi yazınız ve ekleri **05 Şubat 2019** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulunca müzakere edilmiş olup; Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla etik açıdan uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-İmzalı
Prof. Dr. Özgür KASAPÇOPUR
Başkan

e-İmzalı
Prof. Dr. Emine Gülderen ŞAHİN
Dekan a.
Bölüm Başkanı

NOT:Yönetmelik gereği Sonuç Raporunun ve Bilimsel Araştırma Projeleri Desteği onay belgesinin Klinik Araştırmalar Etik Kuruluna iletilmesi gerekmektedir.

EK :
1 dosya elden teslim edilecektir.

Doğrulamak İçin:http://dogrulama.istanbulc.edu.tr/enVision.sorgula/belgedogrulama.aspx?V=BE6E0PV5F

Ayrıntılı bilgi için irtibat : Güler SOYDANER Dahili : 22300
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi 34303 Cerrahpaşa/ İSTANBUL
Tel : 0 (212) 414 30 00 Faks : 0 (212) 632 00 33
e-posta : ctfpersonel@istanbul.edu.tr Elektronik Ağ : www.istanbulc.edu.tr

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

KLEBSIELLA PNEUMONIAE KÖKENLERİNDE KOLİSTİN DİRENCİNİN ÇEŞİTLİ YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ VE DİRENCİN MALDI-TOF YÖNTEMİYLE HIZLI SAPTANMASI

ORİJİNALLİK RAPORU

%9	%6	%2	%7
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	%1
2	acikerisim.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Konya Necmettin Erbakan University Öğrenci Ödevi	%1
4	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	%1
5	www.saglikcalisanisagligi.org İnternet Kaynağı	%1
6	Submitted to Marmara University Öğrenci Ödevi	<%1
7	Submitted to University of Sunderland Öğrenci Ödevi	<%1
8	www.eab.org.tr	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Seçil	**Soyadı**	İSKENDER
Doğ.Yeri	Bakırköy	**Doğ.Tar.**	20.03.1991
Uyruğu	TC.	**TC Kim. No**	13036632374
Email	iskendersecil@gmail.com	**Telefon**	0537 738 06 08

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa	2019
Lisans	Fatih Üniversitesi (%50 Burslu)	2015
Lise	Bahçelievler Lisesi	2010

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
Biyolog	Diamega Biyoteknoloji	2018 – 2019

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama**	**Konuşma**	**Yazma**
İngilizce	İyi	Orta	İyi

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	Çok iyi