

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii*
İZOLATLARINDA İMİPENEM-EDTA/MEROPENEM-EDTA
DİSK YÖNTEMİ VE MOTİFİYE HODGE TESTİ İLE METALLO
BETA-LAKTAMAZ VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Hatice ÇINAR

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Dr.Öğr.Üyesi Merih ŞİMŞEK

Tez No: 2019-011

2019-AFYONKARAHİSAR

KABUL ve ONAY

**Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü**

**Tabbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir**

Tez Savunma Tarihi: 23/05/2019

Dr.Öğr.Üyesi Meriç SİNSEK
Jüri Başkanı

Doç.Dr. Beytullah KENAR
Üye

Doç.Dr. Esra ŞEKER
Üye

Tabbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Hatice ÇINAR'ın "*Pseudomonas aeruginosa*. ve *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Disk Yöntemi ve Motifiye Hodge Testi ile Metallo Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması" başlıklı tezi günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince büyük katkı ve emeği olan, beni her konuda teşvik ederek iyi bir eğitim almamı sağlayan tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Merih ŞİMŞEK'e ve tez jürimde yer alan sayın Doç.Dr.Beytullah KENAR ve sayın Doç.Dr. Esra ŞEKER'e ve birlikte çalıştığımız, bilgi paylaşımında bulunduğumuz anabilim dalı araştırma görevlileri özellikle Cengiz DEMİR ve Hayriye TOKAY'a, beraber yüksek lisans yaptığım Buse CUNDA USTA, Süleyman MANGAL, Yasir NECMETTİN ÜYÜMEZ, Yaşargül ÖZHELVACI'ya teşekkürlerimi borç bilir, saygılarımı sunarım. Yüksek lisans eğitimim süresince Tıbbi Mikrobiyoloji AD.'nın tüm laboratuvar personeline yaptıkları katkılardan dolayı minnettarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü sabrı ve desteği için yol arkadaşım Mahmut AYYILDIZ'a, hayatımın her aşamasında benden desteğini esirgemeyen annem ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

Hatice ÇINAR

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv-v
SİMGELER VE KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER.....	vii
TABLolar.....	viii
I.GİRİŞ.....	1
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2
1.1.2. Mikroskopik Özellikler	3
1.1.3. Kültür Özellikleri.....	3
1.1.4. Biyokimyasal Özellikler	3
1.1.5. Virulans Faktörleri.....	4
1.1.6. <i>P.aeruginosa</i> Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler	7
1.1.7. <i>P.aeruginosa</i> 'da Antibiyotik Direnci Mekanizmaları	7
1.2. <i>Acinetobacter</i> Cinsi Bakteriler	8
1.2.1. <i>Acinetobacter</i> : Tarihçesi ve Sınıflandırması.....	8
1.2.2. <i>Acinetobacter</i> Morfolojik ve Kültür Özellikleri	9
1.2.3. <i>Acinetobacter</i> Virulans Faktörleri ve Patogenezi	11
1.2.4. <i>Acinetobacter</i> Epidemiyoloji	13
1.2.5. <i>Acinetobacter</i> Türlerinde Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları	14
1.3. Beta Laktamazların Sınıflandırılması.....	14
1.4. Beta-Laktamaz Tayini İçin Testler.....	21
1.4.1. Beta-Laktamaz Aktivitesi İçin Direkt Testler	21
1.4.2. Beta-Laktamaz Aktivitesi İçin İndirekt Testler	21

1.5.Metallo-Beta Laktamazlar	23
1.5.1.Metallo-Beta-Laktamazların Sınıflandırılması	23
1.6. Metallo-beta-laktamazların Tespit Edildiği Yöntemler	33
1.6.1. Kombine Disk Testi	33
1.6.2. Çift Disk Sinerji Testi.....	33
1.6.3. MBL E-Test Yöntemi	34
1.6.4. Modifiye Hodge Testi	34
1.6.5. Mikrodilüsyon Yöntemi (MDT)	34
1.6.6. Genotipik MBL Tespit Yöntemleri.....	35
2.GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.BULGULAR	39
4.TARTIŞMA	46
5.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	59
ÖZET	61
SUMMARY	63
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

- EDTA:** Etilen diamin tetraasetik asit
GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
IEF: İzoelektrik nokta tayini
İBL: İndüklenebilir beta laktamaz
MBL: Metalo beta laktamaz
MHA: Mueller Hinton agar
MHB: Mueller Hinton buyyon
MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
TSA: Triptik soy agar
ATCC: American Type Culture Collection
DHP-1 : Dehidropeptidaz-1
DNA : Deoksiribonükleik asit
EDTA : Etilendiamintetraasetik asit
EF2 : Elongasyon faktör 2
ESBL : Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
GIM : German imipenemase
GN : Gram negatif
İMP : İmipenem
MHT : Modifiye Hodge testi
KDDT : Kombine Disk Testi
MİK : Minimum inhibitör konsantrasyon
MP : Meropenem
MPA : 2-merkaptopropionik asit
NaCl : Sodyum klorür
NaOH : Sodyum hidroksit
NFGN : Non fermentatif Gram negatif
OMP : Outer membran protein
PBP : Penisilin bağlayan protein
SIM : Seoul imipenemase
SPM : Sao Paulo imipenemase
VIM : Verona imipenemase

ŞEKİLLER

Şekil 1. İmipenem-EDTA ve meropenem-EDTA disk örnekleri	38
Şekil 2. Modifiye hodge testi; pozitif ve negatif örnekler	38
Şekil 3. <i>A.baumannii</i> izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı	40
Şekil 4. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı	41
Şekil 5. <i>A.baumannii</i> izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı	42
Şekil 6. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı	43
Şekil 7. <i>A.baumannii</i> suşlarının antibiyotik direnç profilleri.....	44
Şekil 8. <i>P.aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik direnç profilleri	45

TABLÖLAR

Tablo 1.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması	20
Tablo 4.1 <i>A.baumannii</i> izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı	39
Tablo 4.2. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı.....	40
Tablo 4.3. <i>A.baumannii</i> izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı	41
Tablo 4.4. <i>P.aeruginosa</i> izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı	42
Tablo 4.5. <i>A.baumannii</i> suşlarının antibiyotik direnç profilleri	43
Tablo 4.6. <i>P.aeruginosa</i> suşlarının antibiyotik direnç profilleri	44
Tablo 4.7. Fenotipik testlerin pozitiflik oranları.....	45

I.GİRİŞ

Pseudomonas aeruginosa ve *Acinetobacter baumannii* gibi bakteriler son yıllarda immün sistemi baskılanmış ve özellikle hastanede yatan hastalarda artan oranlarda görülen fırsatçı enfeksiyonlara neden olan non fermentatif Gram negatif bakteriler olarak bilinmektedir (Wisplinghoff, 2012; Tijet, 2016). Yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösterebilen bu iki bakterinin yol açtığı ciddi enfeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler; geniş antibakteriyel spektrumları, bakteri membranlarından hızla geçebilmeleri, AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle öncelikli olarak tercih edilen antibiyotik grubudur (Livermore, 2000). Karbapenemlerin klinik kullanıma girmesi çoklu ilaç dirençli bakterilerin neden olduğu ciddi hastane enfeksiyonlarında önemli bir avantaj sağlamıştır. Fakat özellikle ampirik tedavide yaygın kullanılmaları nedeniyle *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* gibi non fermentatif bakterilerde karbapenem direnci hızlı bir şekilde artış göstermiştir (Gür, 2004).

Gram negatif basillerin karbapenem direncinden özellikle azalmış dış membran geçirgenliği veya effluks pompa sistemi sorumlu tutulmaktadır. Bunun yanında beta-laktamazlar da dirençde rol alabilmektedir. Karbapenemazlar; sınıf A penisilinazlar, sınıf D oksasilinazlar ve sınıf B metallo-beta-laktamazlardan oluşurlar (Nordmann, 2002).

İlk olarak 1991'de Japonya'da metallo-beta-laktamazlardan (MBL) IMP-1 üreten *P.aeruginosa*'nın bildirilmesinden sonra Japonya başta olmak üzere çeşitli Asya ve Avrupa ülkelerinden Gram negatif basillerde, özellikle *P.aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, yeni metallo-beta-laktamaz (MBL)'lar (IMP, VIM, GIM, SPM) bildirilmiştir ve son 3 yılda bunların sayıları artarak dünya çapında yayılma göstermektedir (Nordmann, 2002; Fritsche, 2005). MBL'lardaki bu hızlı artış hem endişe vermekte hem de bu enzimlerin varlığını ortaya koyacak testlerin geliştirilmesi konusunu önemli hale getirmektedir. MBL aktivitesinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve 2-merkaptopropionik asit (MPA) gibi metal

şelatörler ile inhibe olma özelliklerinden yararlanılarak bu enzimleri erken tanıyabilecek tarama amaçlı basit fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar imipenemli veya seftazidimli EDTA veya MPA disklerini kullanan çift-disk sinerji testi, Hodge testi, saftazidim veya imipenemli EDTA kombine disk testi, MBL Etest ve imipenemli EDTA ya da meropemen EDTA kullanan testlerdir (Duman, 2017; Atasoy, 2014).

Bu çalışmanın amacı, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen tekrarı olmayan *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatları MBL enzimi üreten suşların fenotipik yöntemlerle oranını belirlemek, MBL tayininde bu fenotipik yöntemleri değerlendirmek ve MBL üretiminde fenotipik yöntemleri kullanarak hangisinin rutin uygulamalarda daha yararlı olabileceği amaçlanmıştır.

1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa daha önceki tarihlerde yaralarda, özellikle de ameliyat yaralarında mavi-yeşil renkli irin etkeni olarak göze çarpan ve 1882 yılında Gessard tarafından tanımlanmıştır (Bilgehan, 1995; Baron, 1990). Doğada yaygın olarak bulunur. *P.aeruginosa* suda, toprakta, bitkilerde, böceklerde, balıklarda, amfibialarda, kuşlarda ayrıca insan ve diğer memelilerin gastrointestinal sisteminde hastalık yapmadan bulunur. *Pseudomonas* cinsi *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en önemli nozokomiyal etkeni ve en iyi tanımlanmış türüdür (Vahaboğlu, 2002; Brooks, 1998).

Fırsatçı patojen olarak önemli rol oynamasında distile suda bile çoğalabilecek kadar asgari besin maddesine ihtiyaç göstermesi, sıcaklık dahil, farklı fiziksel şartlara uyum göstermesi yardımcı olur (Brooks, 1998). Dezenfektan ve sıvı sabunlar, temizlik sıvıları, hasta odalarındaki çiçekler gibi birçok ortamdan *P.aeruginosa* suşları izole edilmiştir (Baron, 1990; Vahaboğlu, 2002).

1.1.2. Mikroskopik Özellikler

P.aeruginosa çeşitlilik göstermekle birlikte nispeten 1,5-3 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde, gram negatif çomaktır. Rutinde kullanılan boyama yöntemleriyle kolayca boyanır. Bir ya da birden fazla polar konumlu kirpiği bulunması nedeniyle çok hareketlidir (Baron, 1990; Vahaboğlu, 2002).

1.1.3. Kültür Özellikleri

Aerop üreme özelliği gösteren *P.aeruginosa* üreyebilmek için oksijene gereksinim duyar ve sıvı besiyerinde yüzeyde zar oluşturacak şekilde ürer. Zarın hemen altında mavi-yeşil pigmenti ayırt ile edilebilir. Laboratuvarlarda 30-37°C'de triptikaz soya agar, koyun kanlı agar, çukolata agar, Mueller Hinton agar (MHA), endo ve Mac Conkey gibi besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilir. Diğer Pseudomonas türlerinden ayrılmasında 42°C'de üreyebilme özelliği önemlidir (Baron, 1990; Erdem, 1999; Vahaboğlu, 2002; Brooks, 1998). *P.aeruginosa* kanlı agarda beta hemoliz yapar. Genellikle 3-5 mm büyüklüğünde kenarları düzensiz ve üzeri düzgün görünümde koloni yaparlar. Mukoid tipte olanlar kistik fibrozlu hastalardan izole edilen ve aljinat (mukoid ekzopolisakkarit) oluşturan suşlardır (Baron, 1990; Erdem, 1999; Vahaboğlu, 2002).

1.1.4. Biyokimyasal Özellikler

P.aeruginosa Enterobacteriaceae familyasında bulunan türlerden oksidaz pozitif olması ve glikozu fermente etmemesiyle ayrılır. Laktoz ve sakkaroz etkisizdir. Katalaz ve l-arginin dihidrolaz oluşturur. Lizin dekarboksilaz ve ornitin dekarboksilaz oluşturmaz. İndol ve H₂S üretmez. Metil kırmızısı ve Voges-Proskauer reaksiyonları negatiftir. Potasyum siyanüre dirençlidir. Nitratı nitrite çevirir. Hem organizmada, hem de kültür ortamında hidrosiyanik asit yapma özelliğine sahiptir. Aynı bakterilerin diğer kökenlerine etki ederek onları eriten bakteriyosinler yapanlar; *P.aeruginosa* ve *P.fluorescens* cinsleridir. *P.aeruginosa* etkeni hastane enfeksiyonu

salgınlarında epidemiyolojik takip için kullanılan yöntemlerden biri bakteriyosin tiplendirmesidir (Baron, 1990; Erdem, 1999; Vahaboğlu, 2002; Brooks, 1998).

1.1.5. Virulans Faktörleri

P.aeruginosa'nın virulans faktörleri pigment, hemolizinler, ekzotoksin A, ekzoenzim S, proteazlar (alkali proteaz ve elastaz), yüzey adhezinleri ve aljinattır. Bunlar bakterinin konağa yerleşmesine ve konağa ait hücreleri hasara uğratmasına yardımcı olurlar (May, 1991).

Pigment Oluşumu: *P.aeruginosa* suşlarının büyük çoğunluğu bir yada daha fazla miktarda pigment oluşturur. Yeşil renkli floresein en sık rastlanan pigmenttir. Diğer bir pigmentte turkuaz mavisi renkli piyosiyenin başka hiçbir bakteri türünde bulunmaz. *P.aeruginosa*'nın tanısı için bu özellik önemlidir. Bu her iki pigment hayvan deneylerinde toksik bulunmamıştır fakat diğer türlerden bazılarının üremesini yavaşlatarak kendi kolonizasyon şanslarını artırdıkları görülmüştür. Piyosiyenin pigmenti ek olarak bakteri hücrelerinin demir alımında da görev alır. (Erdem, 1999; May, 1991; Otkun, 1998). Sarı renkli piyoverdin kırmızı renkli piyorubin veya kahverengi piyomelanin pigmentinin ise bazı *P.aeruginosa* suşlarının yaptıkları görülmüştür. Bu suşlar sarı-yeşil, mavi-yeşil, kırmızı, mor ya da kahverengi görünümde besiyerlerinde üremeleriyle özellik kazanırlar. Oksijensiz koşullarda görülmeyen fakat oda ısısında daha belirginleşen bu pigmentler bakteriler tarafından hücre dışına salınırlar. (Baron, 1990; Erdem, 1999; Brooks, 1998).

Hemolizinler: *P.aeruginosa*'nın glikolipid yapısında olan ramnolipid hemolitik aktivite gösteren bileşiklerinden biridir. Ramnolipid ramnoz ve beta-hidroksidekanoid asitten oluşur. Isıya dayanıklıdır ve bu molekül deterjan benzeri bir etki göstermektedir. Akciğer yüzey gerilimini fosfolipaz C ile birlikte fosfolipidler üzerinde oluşturduğu çözücü etki ile inaktive etmektedir. Ayrıca siliyostaza sili trakea hücreleri üzerindeki etkisiyle neden olmaktadır. Ramnolipidin bir diğer etkisi *P.aeruginosa* ile enfekte kistik fibrozlu hastaların akciğerlerinde doku hasarına

neden olmasıdır ve bunu monositlerden oksijen radikalının jenarasyonunu arttırarak yapar.(Erdem, 1999; Delden, 1998). Fosfolipaz C *P.aeruginosa* 'nın hemolitik aktivite gösteren bir diğer bileşimidir. Fosfolipaz C ısıya duyarlıdır ve lesitinden fosforilkolini ayıran bir lesitinazdır. Kistik fibrozlu hastalarda solunum yollarının kolonizasyonu fosfolipaz C'nin önemli bir rol oynadığı tespit edilmiştir. Diğer kültürlerden izole edilen suşlardan ziyade kan kültüründen izole edilen suşların daha fazla fosfolipaz C ürettikleri saptanmıştır (Erdem, 1999; Delden, 1998; Bergman, 1989).

Ekzotoksin A: Ekzotoksin A'nın monositlerden toksik oksijen radikallerinin salınımını artırmasıyla bu bakteri ile enfekte hastalarda oluşan kronik akciğer enfeksiyonlarında doku hasarına neden olmaktadır. Kornea, yanık, yara ve akciğer enfeksiyonlarında önemli bir virulans faktörüdür. Ekzotoksin A difteri toksini ile aynı intrasellüler etki mekanizmasına sahiptir; fakat neden olduğu enfeksiyon tipi çeşitlilik göstermektedir. Bu çeşitliliğin sebebi ekzotoksin A'nın, difteri toksininde olduğu gibi kana karışarak vücudun diğer bölümlerine yayılmadan yerel etki göstermesidir. Bu durumun diğer sebebi ise bakterinin oluşturduğu ekzotoksin A miktarının suşa bağlı olarak değişmesidir. Kandaki ekzotoksin A'nın miktarı geriye dönüşümlü olarak belirgin bir şekilde azalması kronik akciğer enfeksiyonlarında bakterinin nonmukoid fenotipinin mukoid şekle dönüşmesinin sonucudur. (Erdem, 1999; Que, 1987; Woods, 1991).

Ekzoenzim S: Bir veya birden fazla proteini modifiye eden ekzoenzim S ökaryotik hücrelerde bulunur. Mortalite oranı sadece ekzotoksin A veya ekzoenzim S oluşturan suşlara göre kıyaslandığında her ikisini de oluşturan suşlarla enfekte olan hastalarda daha yüksektir. Ekzoenzim S *P.aeruginosa* 'nın etken olduğu kronik akciğer enfeksiyonlarında gözlenen progresif pulmoner patolojide önemli rol oynadığını daha yüksek mortalitenin görülmesi ile göstermektedir (Erdem, 1999; Sokol, 1981; Woods, 1985).

Proteazlar (alkali proteaz ve elastaz): *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının patogeneğinde rol oynayan en önemli virulans faktörleri arasında alkali proteaz ve elastaz vardır. Bunlar jelatini, kazeini, laminini ve immünoglobulinleri parçalarlar. Alkali proteazdan farklı olarak elastaz, albümin, fibrin ve elastini de parçalamaktadır. *P.aeruginosa* 'nın konağın ilk savunma hattından kaçışında önemli olan proteazların *P.aeruginosa* ile kronik olarak enfekte kistik fibrozlu hastaların tükürüğünde saptanan konsantrasyonlarda, insan periferik kan nötrofillerinin kemotaksisini inhibe etmesidir. Bakterinin üremesine, çoğalmasına ve sonuçta kolonizasyon oluşturmaya bu kaçış mekanizması neden olmaktadır (Colin, 1997; Yağcı, 2002; Wretling, 1983).

Yüzey Adhezinleri: *P.aeruginosa* 'nın yüzeyinde biri polar yapıdaki pili veya fimbriya, diğeri ise aljinat veya mukoid ekzopolisakkarit olan iki adhezin bulunmaktadır. İmmün sistemi baskılanmış hastaların üst solunum yollarının ve hasar görmüş alt solunum yolu epitellerinin kolonizasyonunda piliye bağlı tutunma önem kazanmaktadır. Bakterinin pilileri aracılığıyla enfeksiyon süreci ilk olarak yanak epitel yüzeyindeki belirli reseptörleri tanınması ve yapışmasıyla başlamaktadır. *P.aeruginosa* normal kişilerin yanak epitelinden ziyade kistik fibrozlu hastaların yanak epiteline daha iyi tutunabilmektedir. Hastaların tükürüğünde bulunan proteazlar hücre yüzeyinden fibronektini ayırmaktadır. Bu şekilde pilinin tanıdığı yanak epitel hücreleri ve trakeal epitel hücre yüzeyindeki reseptörler açığa çıkmaktadır. Hasar görmemiş normal trakeal epitel hücrelerine *P.aeruginosa* 'nın mukoid suşları nonmukoid suşlardan daha fazla miktarda tutunabilmektedir. Üst solunum yollarının kolonizasyonunda piliye bağlı tutunma önem kazanırken, mukosilyer atılımın hasar gördüğü durumlarda, alt solunum yollarının kolonizasyonunda ilk basamağı aljinata bağlı tutunma oluşturmaktadır ve burada epitel hücrelerinde belirgin bir hasar gerekmemektedir (Baron, 1990; Denton, 1997; Doig, 1989).

Aljinat (Mukoid Ekzopolisakkarit): Anyonik bir polisakkarittir. *P.aeruginosa* 'nın aljinatı antifagositik etkisi nötrofillerin kemotaksisini inhibe etmesi, komplemanı alternatif yoldan aktive etmesi ve bakteriye karşı zayıf opsoninlerin oluşmasından kaynaklanmaktadır. (Pitt, 1989).

1.1.6. *P.aeruginosa* Enfeksiyonlarının Tedavisinde Kullanılan Antibiyotikler

P.aeruginosa enfeksiyonlarında antibiyotik kullanımı duyarlılık deneyi sonuçlarına göre yönlendirilmelidir. Çünkü çok sık görülen direnç sorunları vardır. *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisinde penisinlerden tikarsilin, piperasilin ve mezlosilin gibi; sefalosporinlerden seftazidim, sefooperazon, sefotaksim, seftriakson ve sefepim gibi; karbapenemlerden imipenem ve meropenem gibi; monobaktamlardan aztreonam gibi ; aminoglikozidlerden amikasin, gentamisin ve tobramisin gibi; uzun etkili tetrasiklinler olanlarda tetrasiklin minosiklin ve doksisisiklin gibi; florokinolonlardan siprofloksasasin ve levofloksasin gibi antibiyotikler kullanılmaktadır (Bilgehan, 1995; Baron, 1990; Vahaboğlu, 2002). Beta laktamlar, hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubu olan ve kimyasal yapılarında ortak bir beta laktam halkası taşırlar. Beta laktam beş temel alt gruba ayrılırlar; beta laktam halkasına bağlı yan zincirler ve diğer halkalara göre penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere. Bu antibiyotikler gerek toplum gerekse hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyellerin başında gelmektedir. Ancak bu yaygın kullanıma paralel olarak bakterilerin de yeni direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Beta laktam antibiyotiklere direnç oranlarının giderek arttığı saptanmıştır.(Gülay, 2001).

1.1.7. *P.aeruginosa* 'da Antibiyotik Direnci Mekanizmaları

Biyofilm Direnci: Biyofilm içindeki mikroorganizmalar belli bir ölçüde saklı kaldıkları için fagositik hücreler tarafından tanınmamakta ve bu nedenle fagositozdan korunmaktadırlar. Polianyonik bir bariyer oluşturarak biyofilm aynı zamanda antimikrobiyal ilaçlar için ilaç direncine yol açmaktadır. Özellikle beta laktam antibiyotiklerin hücre içine nüfuz etmesini önleyerek tedaviyi güçleştirmektedir. Ayrıca biyofilmin alt katmanlarına doğru pH değeri yedinin altına inmesinden dolayı antibiyotiklerin işlevleri bozulmaktadır. En alt katmanlarda ise oksijen geçişi yoktur ve anaerob koşullar oluşmaktadır. Bu nedenle antipseudomonal ajanlar tek başlarına etki edememektedirler (Yoon, 2006).

Pompa (Efluks) Direnci: Pompa direnci bakterilerdeki yaygınlığı ve etkinliği daha yeni anlaşılmaya başlayan bir mekanizma olmasına rağmen eskiden beri bilinen bir mekanizmadır. Bakterilerde yer alan efluks pompa sistemini transport proteinler oluşturur. Pompa sistemi, ekspresyon düzenleyici olan bir gen kontrolünde çalışır. Bakteride hücre içi antibiyotik düzeyi antibiyotik dışarı pompalanınca düşer, ribozom antibiyotik etkisinden korunur ve bu nedenle protein yapımı yani bakteri üremesi devam eder. Substratlardan herhangi biri ile karşılaşmasıyla pompa sistemi indüklenirse, düzenleyici gene mutasyon ile pompa proteinlerinin ekstrem üretimi başlayabilir. Bir ya da birden çok substrata direnç şeklinde sonuçlanır. Gelişen direnç düşük düzeylidir ancak bir mutasyon başka mutasyonları harekete geçirebileceğinden, genellikle düzenleyici gen mutasyonunun ardından bakteride antibiyotiğin bağlandığı hedefin değişmesi, antibiyotiğe geçirgenliğinin azalmasına yol açacak şekilde porin üretiminin bozulması veya antibiyotiği parçalayan bir enzimin sentezlenmesi gibi durumlarla diğer bir mutasyon gelişir ve böylece direnç düzeyi katlanarak artar (Öztürk, 2002).

1.2. Acinetobacter Cinsi Bakteriler

1.2.1. Acinetobacter: Tarihçesi ve Sınıflandırması

Acinetobacter Hollandalı mikrobiyolog Martinus Willem Beijerinck tarafından ilk defa 1911 yılında tanımlanmış ve *Micrococcus calcoaceticus* olarak adlandırılmıştır. Günümüze kadar birçok değişik isimle adlandırılmış, tanımlanmaları ve sınıflandırmaları oldukça karmaşık zamanlardan geçmiştir. 15'in üzerinde farklı jenerik isimle bilim adamları tarafından adlandırılmışlardır. Bu adlandırmalardan bazıları *Herellea Vaginicola/Mima polymorpha Bacterium anitratum, Alcaligenes, Achromobacter Micrococcus calcoaceticus, B5W, Moraxella glucidolytica* ve *Moraxella lwoffii*'dir (Peleg, 2008). 1971'de Acinetobacter cinsi olarak Brisou ve Prevot'un 1954 yılında Yunanca hareketsiz anlamına gelen "Akinetos" sözcüğünden esinlenerek bu bakterilere Acinetobacter adının verilmesini önermesi 1968'de Baumann ve ark.'nın yapmış olduğu çalışmaların ardından kabul görmüştür ve Moraxellaceae ailesi içinde sınıflandırmadaki yerlerini almışlardır. (Peleg, 2008).

Amerikan Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezinin (Centers for Disease Control and Prevention (CDC)) sınıflamasına göre Acinetobacter türleri oksidaz negatif grup ile birlikte nonfermentatif gram negatif basiller içerisinde CDC Grup EO-5, CDC Grup NO-1 ve Bordetella türleri içerisinde yer alırlar (Schreckenberger, 2003). Deoksiribonükleik asit (DNA) benzerlikleri esas alınarak yapılan çalışmalarda 33 genomik tür tanımlanmış, 18 genomik türe isim verilmiştir. Bunlardan bazıları *A. calcoaceticus*, *A.baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. junii*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii*, *A. radiorezistens*, *A.schindleri*, *A.ursingii*'dir. Diğer türler isimlendirilememiştir (Towner, 2009). Acinetobacter türleri sakkarolitik ve asakkarolitik olarak ele alınmıştır. Çünkü DNA gruplarını klinik laboratuvarlarda fenotipik testlerle ayırt etmek güçtür. *A.baumannii* glikozu okside eden, hemolitik olmayan izolatlarının birçoğu, *A. lwoffii* glikoz negatif hemolitik olmayanlar, *A. haemolyticus* ise hemolitik olanlar şeklinde tanımlanmıştır (Schreckenberger, 2003). *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* ve *A. lwoffii* klinik literatürde sık rapor edilen Acinetobacter türleridir (Munoz-Price ve Weinstein, 2008). *A.baumannii* ise en sık ve en önemli klinik tablolara yol açan türdür (Bergogne-Berezin, 1996).

1.2.2. Acinetobacter Morfolojik ve Kültür Özellikleri

Acinetobacter cinsindeki bakteriler nonfermentatif, oksidaz negatif, katalaz pozitif, indol negatif, hareketsiz, nitratları redükte etmeyen, aerop gram negatif ve 1-1,5 µm x 1,5-2,5 µm boyutlarındaki mikroorganizmalardır (Bahar, 2008). Taze kültürlerinden ve kan kültür şişelerinden hazırlanırlar ve yaymalarda gram pozitif boyanabilirler. Kanlı agarda sabit üreme fazında genellikle kokobasil formu görülürken, sıvı besiyerinde erken üreme döneminde veye hücre duvarında aktif antimikrobiyal ajanları içeren plaklarda sıklıkla basil formunda görülür. Oksidatif fermentatif besiyerinde ve üç şekerli demirli besiyeri (TSİ) asit oluşturmazlar. Fimbriaları vardır fakat flajellaları yoktur (Bergogne-Berezin, 1996). Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin olarak kullanılan eozin-metilen blue (EMB) agar koyun kanlı agar, , triptik soy agar ve MacConkey besiyerlerinde kolayca ürerler. Koyun kanlı agarda 0,5-2 mm çapında, şeffaf veya opak, zeminden kabarık koloniler oluştururken diğer ürettiği besiyeri olan MacConkey agarda renksiz veya

hafif pembe renkte koloniler oluştururlar (Winn, 2006). Kùltürlerde bu bakterilerin izole edilmesinde kullanılabilecek seçici ve ayırt edici besiyerleri geliştirilmiştir. Bu amaçla Leeds Acinetobacter Medium ve Holton's agar kullanılmaktadır. Bu besiyerleri diğer mikroorganizmaların üremelerini inhibe eden safra tuzları, bromkrezol moru, laktoz, maltoz şekerlerini içeren Herellea agar, vankomisin, sefsulodin, sefradin gibi antibiyotikleri içerirler. Bakterileri dışkı gibi kontamine örneklerden izole etmek mümkündür. Bunun için amonyum veya nitrat tuzları içeren pH 5.5-6.0 olan sıvı mineral besiyerine 24-48 saat sallanarak yapılan inkübasyon sonrası seçici besiyerine inoküle edilerek izole edilebilir. (Jawad, 1994).

Geleneksel yöntemlerle Acinetobacter tür ayrımı yapılır fakat glikoza oksidatif etki, hemoliz ve 44°C'de üreyebilme yeteneği ile değerlendirilir. En sık karşılaştığımız türlerin ayrımına baktığımızda; *A.baumannii* glikozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 44°C'de üreyebilenler kökenler, *A. calcoaceticus* glikozu oksitleyen ve hemoliz yapmayan, 37°C'de üreyebilen kökenler, *A. lwoffii* glikoz negatif kökenlerden hemoliz yapmayanlar, *A. haemolyticus* ise hemoliz yapanlar olarak sınıflandırılmıştır. (Schreckenberger, 2008)

Acinetobacter'ler karbon kaynaklarının asimilasyonu temeline dayanan yarı otomatize ve otomatize sistemlerle de tanımlanabilir ancak moleküler yöntemler en duyarlı yöntemlerdir. Tanımlandığı farklı yöntemlerde vardır. Bunlar; Protein profili, serotiplendirme, bakteriyosin ve faj tiplendirme, multilokus enzim elektroforez ile tipleme, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), ribotipleme, Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), rastgele amplifiye polimorfik DNA analizi (RAPD) gibi yöntemlerdir.(Seifert, 1993).

1.2.3. Acinetobacter Virulans Faktörleri ve Patogenezi

Acinetobacter cinsine ait olan bakterilerin düşük virülans potansiyeline sahip olduğu geçmiş yıllarda düşünölmekteydi. Ancak Acinetobacter enfeksiyonlarının

prevalansında artış görülmektedir. Bu artış güçlü yeni antimikrobiyal ajanların tedavide yerini alması ve hastanelerde özellikle yoğun bakım ünitelerinde invaziv işlemlerin artmasına bağlı olarak artmıştır. Bu organizmaların yüksek patojeniteye sahip olabildiğini ve invaziv hastalığa yol açabileceğini Toplum kökenli fulminan Acinetobacter pnömonisinin görülmesi göstermektedir (Doughari, 2011). Genelde fırsatçı hastane enfeksiyonlarına neden olurlar (Bahar, 2008). Bakterinin yaygın antibiyotik direnci geliştirebilme, hastane ortamında ve tıbbi cihazlarda kısıtlı koşullar altında bile yaşayabilme yeteneği *A.baumannii* enfeksiyonlarının önlenmesi ve tedavisinde yaşanan zorluklardandır (Towner, 2009). Aşağıdakiler Potansiyel virülans etmenleri arasında sayılabilir.

a-Hücre Yüzey Özellikleri: Bakterilerin yüzey özellikleri ve ürünleri konak dokularında hasara neden olarak enfeksiyonların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. Acinetobacter cinsi hücrelere hidrofobik yüzey bileşenleri aracılığıyla tutunur ve bunun nedeni lipopolisakkarid O antijeninin hidrofobik özellik göstermesidir. Bu tutunmada Polisakkarid kapsül benzeri yapılar ve ince fimbria da rol almaktadır. Son yapılan çalışmalarda K1 kapsül yapısının önemli bir virülans faktörü olduğu gösterilmiştir (Çiftçi, 2011).

b-Dokulara Yapışma ve Hasar Oluşturma: *A.baumannii* önceleri Omp38 olarak adlandırılmaktaydı ve OmpA (AbOmpA), küçük maddelerin geçişinde rol alan, 38 kda moleküler ağırlığına sahip bir yüzey proteindir ve bu da *A.baumannii*'nin epitelyal hücrelere invazyonundan ve yapışmasından sorumludur (Çiftçi, 2011).

c-Litik/Toksik Bileşik Üretimi: Konağın immün yanıtı ve klinik semptomlar ile lipopolisakkarid yapıların ilişkili virülans faktörleri olabileceği düşünülmektedir (Pantophlet, 2008). Ayrıca lipid yıkımına neden olan ekstraselüler enzimler üretirler (Çiftçi, 2011).

d-Biyofilm Oluşumu: *A.baumannii* ni bazı antimikrobiyal ajanlara karşı koruyan biyofilm oluştururlar ve bu biyofilm oluşumuyla hastane ortamında ve cihazların yüzeyinde uzun süre canlı kalırlar. Bu nedenle özellikle kateter kaynaklı enfeksiyonlara neden olmaktadır (Can, 2006). *A.baumannii* nin hücrenin çevresine yayılmış aynı zamanda bakterinin hücrenel bir komponenti olan uzun filamanların abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunu sağladığı görülmüştür. Bu filamanların, bakterinin hareketsiz olması nedeniyle yüzeylere sıkıca yapışabilen tip-1 pililer olduğu düşünülmektedir (Tomaras, 2008).

e-Quorum Sensing (QS): QS mekanizması “Minimum popülasyon birimini algılama” olarak adlandırılır ve bakteri etrafındaki popülasyon yoğunluğunu saptar. Bu bilgiyi birçok genin düzenlenmesini kontrol etmekte kullanır. Bu sistem sayesinde bakteri enfeksiyon sırasında virülans faktörlerinin düzenlenmesi sonucu konağın immün yanıtından kaçabilir. Ayrıca davranışlarını koordine ederek besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir ve bunun sayesinde aynı besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir (Çiftçi, 2011)

f-Demir Kazanım Mekanizmaları: Önemli virülans etmenleri arasında yer alan bir diğer mekanizma da bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliğidir. *A.baumannii* izolatları, bağımsız demir kazanım sistemine -ki bu da konağa kolonize olmayı sağlar- ve farklı demir kaynaklarını kullanabilme yeteneğine sahiptir. Bakteriler, siderofor aracılı ve/veya hemin kazanım fonksiyonlarını eksprese etmesi demir kazanım kapasitelerindeki farklılığa göre değişkenlik gösterir. (Çiftçi, 2011)

g-Hastane Ortamında Sağkalım: Bakterini salgınların ortaya çıkmasına neden olabilmektedir bunu da sınırlı besin koşullarında ve kuru yüzeylerde yaşayabilme yeteneği hastane cihaz ve ekipmanlarındaki kolonizasyonun uzun süreli olması yol açmaktadır. *A.baumannii* nin, tıbbi cihazlar, yatak, eldivenler, elektrikli ekipmanlar ve tıbbi giysiler gibi abiyotik yüzeylerde günlerce hatta haftalarca yaşama yeteneğine sahiptir. Bu da özellikle düşükün hastalar arasında meydana gelen

nozokomiyal salgınlarda *A.baumannii*' nin hastane ortamındaki inatçı sağkalımının önemini ortaya çıkarmaktadır. Bakterinin nozokomiyal çevrelerde uzun süre canlı kalabilme yeteneğinin yanında geniş antibiyotik direncine sahip olabilmesi enfeksiyonunun kontrolünü ve tedavisini güçleştirmektedir (Fournier, 2006).

1.2.4. Acinetobacter Epidemiyoloji

Acinetobacter türleri cansız yüzeylerde günlerce canlı kalabilmektedirler. Bunu da kuruluğa dayanıklı olmaları, farklı ısı ve pH ortamlarında canlı kalabilmeleri ile sağlarlar. Acinetobacter türleri günlerce canlı kalabildiklerini hastane havası, buhar makinesi, musluklar, yatak kenarları, tansiyon aletleri, anjiyografi kateterleri ve mekanik ventilasyon cihazlarından izole edilmesiyle gösterilmiştir (Ayan, 2003). Yaşamlarını sürdürebilmek için gereksinimlerinin az olması ve çeşitli karbon kaynaklarını kullanabilme avantajına sahiptir; bu nedenle doğada toprak, su ve yiyeceklerde saprofit olarak serbest yaşayabilmektedirler (Bahar, 2008). Solunum yollarında, genitoüriner sistemde, aşağı gastrointestinal sistemde koltuk altı, kasık gibi nemli bölgeler başta olmak üzere derinin normal florasında ve ağız boşluğunda bulunabilirler (Bergogne-Berezin, 1996 34). Hastanede yatan hastalarda deri kolonizasyonunun %40'ın üzerinde olduğu bildirilirken sağlıklı insanların normal deri florasında kısa süreli düşük yoğunlukta bulunabilirler (Hartzel, 2007). Hasta bakımı sırasında sağlık personelinin kontamine olmasına ve etkenin sürekli yayılmasına deri taşıyıcılığı oranlarının yüksek olması neden olmaktadır (Bergogne-Berezin, 1996). Yoğun bakım ünitelerindeki hastaların dışkılarında dirençli Acinetobacter türleri izole edilmiştir. Trakeostomili hastaların %45'inde kolonizasyon saptanmıştır (Schreckenberger, 2003). Yoğun bakım ünitelerinde uzun süre yatış risk faktörlerinden bazıları; antibiyotik tedavisi, cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyondur. (Schreckenberger, 2003).

1.2.5. Acinetobacter Türlerinde Antibiyotik Direnci ve Mekanizmaları

İlk in-vitro çalışmalarda pek çok klinik izolat sık kullanılan antimikrobyal ajanlara duyarlı bulunmuş, bunlar; ampisilin, gentamisin, kloramfenikol ve nalidiksik asit gibi. Ancak süreç içerisinde *A.baumannii* kompleksine ait klinik izolatların direnç oranlarında artış görülmüştür. Günümüzde izolatların büyük bir kısmı sık kullanılan antibakteriyel ajanlara dirençlidir. Bunlar da; aminopenisilinler, üreidopenisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler, çoğu aminoglikozidler, kinolonlar, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi. Son yıllarda Acinetobacter türlerinde meydana gelen çok ilaca dirençli Acinetobacter enfeksiyonları tedavisinde karbapenemlerin (imipenem, meropenem) yoğun şekilde kullanımına neden olmuştur. Bazı izolatlar da tüm geleneksel antibiyotik ajanlara dirençli bulunmaktadır. Ancak, günümüzde Acinetobacter klinik izolatlarında yüksek oranda karbapenem direnci tüm dünyadan bildirilmektedir (Çiftçi, 2011). Nozokomiyal Acinetobacter izolatlarının beta laktamaz üretimi, efluks pompası ve porinlerdeki değişiklikler sıklıkla kullandığı direnç mekanizmalarıdır. Ayrıca bilinen diğer antibiyotik direnç mekanizmaları antibiyotikleri değiştiren enzimler, hedef bölge mutasyonları, ribozomal mutasyonlar veya değişiklikler, metabolik bypass mekanizmaları ve lipopolisakkaritteki mutasyonlardır. (Lee, 2010).

1.3.Beta Laktamazların Sınıflandırılması

Beta laktamlar başlıca 4 grupta toplanır. Bunlar penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerdir. Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç üç önemli mekanizma ile gelişmektedir (Lee, 2001).

1. İlacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşmasının engellenmesi
2. Hedef penisilin bağlayan protein (PBP) moleküllerinin değişmesi
3. İlacı inaktive eden beta laktamaz enzimlerinin üretimi

Bakterilerin antibiyotiklere karşı kendilerini korumak için en sık kullandıkları mekanizma enzimler yolu ile antibiyotiğin inaktive edilmesidir (Livermore, 1995). Bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda beta-laktamaz genleri bulunabilir. Bu enzimler, gram negatiflerde periplazmik aralıkta bulunurken gram pozitif türlerde doğrudan dış ortama salınırlar(Gülay, 2003). Bu nedenle gram negatif bakteri türlerinde beta-laktamazlara

bağlı dirençte sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da görev almaktadır (Cornaglia, 2000). İlk beta laktamaz enzimi olan penisilinaz penisilinin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra tanımlanmıştır.

Penisilinaz sentezleyen stafilokoklar penisilinin geliştirilmesinden sonraki 20 yıl içinde tüm dünyaya yayılmaya başlamıştır. Beta laktamazlar üzerindeki çalışmalar bunlar üzerinde yoğunlaşmıştır. İlk beta laktamaz enzimi 1960'lı yılların başında gram negatif bakterilerde *E.coli*' de tanımlanmış ve TEM-1 olarak adlandırılmıştır (Medeiros, 1984). Hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakteriler tarafından üretilirler fakat beta laktamazlar Enterobacteriaceae üyeleri ve non-fermentatif Gram negatif bakterilerdeki beta laktam direncinin en önemli mekanizmasını oluştururlar.

Bu enzimlerin gruplandırmasını zorunlu hale getiren beta-laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artıştır. Beta laktamazların sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırılma kullanılır ve bu sınıflandırmada substrat profilleri ve inhibitörlere duyarlılık gibi işlevsel özellikleri değerlendirilir. Diğer sınıflandırma olan Ambler'de ise moleküler yapılarına göre değerlendirme yapılır.

Beta-laktamazlar moleküler yapılarına göre iki geniş gruba ayrılırlar, aktif bölgelerindeki serin aminoasiti bulunanlar veya çinko (Zn^{+2}) atomu bulunanlar olmak üzere. Ambler sınıflamasına göre bu iki grubun üyeleri dört moleküler sınıfta yer alırlar:

Sınıf A beta-laktamazlar; aktif bölgelerinde bir serin aminoasiti bulunur. Temel substratları penisilinler olan beta-laktamazlardır ve bu enzimlerin çoğu plazmidlerle taşınırlar.

Sınıf B beta-laktamazlar; aktif bölgelerinde Zn^{+2} bağımlı bir thiol grubu bulunduran metalloenzimlerdir. Çoğu karbapenamaz aktivitesi taşımaktadır.

Sınıf C beta-laktamazlar; Amp C tipi enzimler olarak adlandırılabilir kromozomal amp C geni tarafından kodlanmasıyla nedeniyle ve Salmonella spp. haricinde tüm gram negatif basillerde bulunan beta-laktamazlardır. Bu enzimler de aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşıyan ve temel olarak sefalosporinaz niteliğindedirler. Sınıf C beta-laktamazlar PBP'lerden köken almış olabilirler bunun nedeninin yapı olarak PBP'lere çok benzemeleri olarak düşünülmektedir.

Sınıf D beta-laktamazları, serin proteazlardır ve oksasilinin hızla hidrolize edebilme yeteneğindedirler. Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından 1995 yılında beta-laktamazların yapısal özellikleri yanısıra substrat profilleri, inhibitörlere duyarlılık gibi işlevsel özelliklerinin de değerlendirildiği yeni bir fonksiyonel sınıflama önerilmiştir. Günümüzde en yaygın olarak bu sınıflama kullanılmaktadır (Tablo 2.1) (Bush, 1995)

a. Bush Grup 1 Kromozomal Enzimler (Amp C beta-laktamazlar)

Gram negatif basillerin birçoğunda yaygın olarak kromozomal beta-laktamazlar bulunmaktadır, ancak bunların miktarı, sentez yolu ve dirençteki üstlendikleri rolleri farklı farklıdır (Gür, 2005) Ambler grup C enterik bakterilerin büyük çoğunluğunda bulunan kromozomal enzimlerdedir ve Amp C olarak da tanımlanabilmektedir. Bu enzimler 1., 2. ve 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları aktif bölgelerinin özellikleri nedeniyle hidrolize edebilirler (Medeiros, 1997). Grup 1 kromozomal enzimlerin etkilerine göreceli olarak dayanıklı olan sefepim Sefalosporinlerdendir. Karbapenemler üzerine etkileri son derece azdır fakat bu enzimlerin aşırı üretimi dış membran porin değişiklikleri gibi bir diğer mekanizma ile birleştiğinde karbapenem direncine neden olabilmektedirler. Bu enzimler klavulanik asit ve sulfonların beta-laktam halkalarına aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle bağlanmazlar. Bu nedenle de bu beta-laktamaz inhibitörlerine dirençlidirler (Wiedemann Bi Dietz, 1998).

Grup I beta-laktamazlar indüklenebilir özelliğe sahiptir. İndüksiyona gerek olmaksızın yüksek oranda beta-laktamaz üreten (dereprese) mutantların bulunmasıdır

Bu tip beta-laktamazları üreten türlerde esas sorundur. Yukarıda sözü edilen ve kromozom kontrolünde olan Amp C enzimlerinin plazmid kontrolünde olan türleri 1989 yılından itibaren bulunmaya başlanmıştır. Bu enzimler indüklenebilen Amp C sentezlediği bilinen *Enterobacter* ve *Citrobacter* haricinde *E.coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.* ve *Proteus mirabilis* gibi bakterilerde de gözlenmektedir. Plazmid kökenli aktarılabılır kromozomal Amp C beta-laktamaz genlerinin plazmidlere transfer olması ile Amp C tipi beta-laktamazlar gelişmiştir (Negri, 2000). Ancak plazmid kökenli Amp C tipi enzimler parental enzimlerden indüklenebilir olmamaları ile ayrılırlar. Günümüzde Amp C tipi plazmid kökenli enzimlerin sayısı 20'yi aşmıştır. MIR,FOX, MOX, BİL, CMY, LAT olarak isimlendirilmiştir (Livermore, 1995).

B- Grup 2 Beta-Laktamazlar

Grup 2a Klavulanik asit ile inhibe olan penisilinazları içerir ve Gram pozitif bakterilerin penisilinazlarının birçoğu bu grupta yer almaktadır. Penisilini bu gruptaki enzimler sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize etmektedir. Betalaktamaz enzimlerinin en sık bulunduğu gram pozitif bakteri Stafilokoklardır. Bunlardaki betalaktamazlar plazmid kontrolündedir. Benzilpenisilin, aminopenisilinler ve karboksipenisilinlere karşı aktiftir (Bush, 1995).

Grup 2b'de yer alan enzimler penisilin ve sefalosporinlerdir. Bu enzimler de klavulanik asit ile inhibe olurlar. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri yaygın olarak bulunur, plazmid kontrolündedir ve bu grupta yer almaktadır (Bush, 1989). Düşük düzeyde direnç dar spektrumlu sefalosporinlere gözlenmektedir. En etkili inhibitör kombinasyonları Piperasilin-tazobaktam ve sefoperazon-sulbaktamdır (Livermore, 1995). Grup 2b'de *Haemophilus influenzae*'nin ROB-1 enzimi de yer almaktadır (Bush, 1995).

Grup 2be Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) içeren gruptur. GSBL'lar penisilinler ve seturoksim, sefotaksim, seftriakson, seftizoksim, seftazidim,

sefpirom ve sefepim gibi oksimino-aminotiazolil sefalosporinleri hidrolize etmektedir.

Karbapenemler ve sefamisinler bunlara dayanıklıdır (Gür, 2005). GSBL'lar klavulanik asit, tazobaktam ve daha az oranda sulbaktam gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. GSBL'ler iki gruba ayrılabilir;

1 -TEM ve SHV türevi GSBL'ler

2 -TEM ve SHV dışı GSBL'ler (PER-2, VEB-1, GES-1, GES-2, CTX-M)

Grup 2br'de TEM ve SHV enzimlerinin inhibitörlere dirençli mutantları bulunmaktadır (Bush, 1995). İnhibitörlere dirençli enzimlerin çoğu inhibitörlere Rezistan TEM (IRT) olarak adlandırılır TEM türevi oldukları için bu şekilde adlandırılırlar.

Grup 2c, bu grup klavulanik asit ile inhibe olan ve karbenisilini hidroliz eden enzimleri içermektedir. PSE-1, PSE-3, PSE-4 enzimleri, *Moraxella catarrhalis*'m BRO-1 ve 2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1 enzimi bu gruptadır (Bush, 1995)

Grup 2d'de OXA grubu enzimler oksasilini hızla hidrolize edebilir ve bu grupta yer almaktadır. OXA tipi enzimlerden özellikle iki alt sınıf güncel önem taşımaktadır;

1) Plazmid veya integron kökenli, seftazidim veya sefotaksim, sefepim, aztreonamı inaktive edebilen enzimler OXA tipi genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır.

2) Özellikle *A.baumannii* izolatlarında görülen moleküler sınıf D'de bulunan karbapenemleri hidrolize eden enzimlerdir. (Gülay, 2003). Bu enzimler modifiye Hodge testi ile karbapenemaz aktivitelerini gösterilebilirler. Karbapenemaz aktivitesi bulunan metallo enzimlerden EDTA'ya dayanıklı olmalarına karşı klavulanik asit ve tazobaktama kısmen duyarlı olmaları ile ayrılabilirler.

Grup 2e, Sefalosporinazları içermektedir. Bunlarda klavulanik asit ile inhibe olurlar. *Stenotrophomonas maltophilia*'nın kromozomal L-2 enzimi, *Bacteroides fragilis* ve *Proteus vulgaris* kromozomal enzimleri bu gruptadır (Livermore, 1995)

Grup 2f, Karbapenem antibiyotikleri inaktive eden, ancak metallo enzim olmayan serin beta laktamazları içermektedir (IMI-I, NMC-A) (Ambler sınıf A).

C- Grup 3 Beta Laktamazlar

Aktif bölgelerinde bir Zn^{+} iyonu bulunmasıyla şimdiye kadar gördüğümüz enzimlerden farklı olan enzimlerdir. Bundan dolayı bu enzimler klavulanat, tazobaktam, sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerinde etkilenmezler fakat EDTA gibi bir metal şelatörü ile inhibe olurlar. Bu gruptaki enzimler hem kromozomal hem de plazmid kökenlidirler. Günümüzde MBL'arın IMP, VIM, SPM-1 ve GIM-1 gibi enzimlerinin sayısı oldukça artmıştır. Bu enzimler kodlayan genler integronlar üzerinde yer almaktadır (Gülay, 2003). MBL'lar içerisinde üç işlevsel grup vardır;

1. Alt grup 3a,
2. Alt grup 3b
3. Alt grup 3c

D- Grup 4 Beta Laktamazlar

Bu grupta yer alan penisilinazlar klavulanik asit ile inhibe olmazlar. Henüz dizgi analizi yapılmamış veya diğer gruplara girmeyen çeşitli beta-laktamazlardır. *Alcaligenes faecalis*, *B. fragilis* kromozomal enzimleri bu gruptadır (Bush, 1989).

Tablo 1.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması

Bush-Jacoby-Mederios Sınıflaması	Temel Alt gruplar	Ambler Sınıflaması	Öncelikli Substrat/Temel Özellikler/ Enzimler
Grup 1		C	Sefalosporinazlar/ karbapenem hariç Bütün beta laktamlara dirençli, klavulanik asit ile inhibe olmaz/ Kromozoma! enzimler: Snar, CMY-3b, Yent,Pstu. Plazmid kökenli enzimler: CMY-1-9, FOX-1-5, LAT-1-4, MIR-1, MOX-1-2, ACT-I, ACC-1
Grup 2 (Klavulanik asit ile inhibe olurlar)	2a	A	Penislinler/ Stafilokok penislinazları
	2b	A	Penisilinler, dar spektrumlu sefalosporinler/ TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11, SHV-19, ROB-1
	2be	A	Penislinler, setamsinler hariç tüm setalosporinler. monobaktamlar/Genişletilmiş spektrumlu/ TEM ve SHV türevi enzimler, PER-1, PER-2, CTX-M, TOHO1-2
	2br	A	Penislinler/İnhibitöre dirençli TEM (IRT)'LER, SHV-10, SHV-26 (SHV kökenliler GSBL etkisindedir)
	2c	A	Penisilin, Karpenisilin/PSE-1, PSE-3, PSE-4, BRO-1-3, CARB3-5.
	2e	A	Setalosporinler/ P.vulgaris'in indüklenabilir selalosporinazı
	2f	A	Penisilin, setalosporin, karbapenemler. monobaktamlar/ Klavulanik asit ile inhibe olan karbapenemazlar/ İMİ-1, NMC-A, Sme-1-2, KPC-1 Oksasilin, penislin/Dar spektrumlu: OXA1-10, OXA-20-27, OXA-30-31 GSBL etkinliğindekiler: OXA-1 1-19, OXA-28 Karbapenemleri hidrolize edenler: OXA-23-27
	2d	D	
Grup 3 (EDTA ile inhibe olurlar)	3a	B	Monobaktamlar hariç tüm beta laktamlar. BC-II,CcrA.B, PCM-1, L-1
	3b		Aeromonas türlerinin metallo enzimler Legionella metallo-beta-laktamazı
	3c		
Grup 4			Diğer gruplara girmeyen veya henüz dizgi analizi yapılmamış çeşitli beta-laktamazlar

1.4.Beta-Laktamaz Tayini İçin Testler

1.4.1.Beta-Laktamaz Aktivitesi İçin Direkt Testler

Haemophilus influenzae, *Moraxella catarrhalis* ve *Neisseria spp.* ler için daha çok direkt testler kullanılmaktadır. Daha çok penisilin ile kromojenik sefalosporinler, iyodin ve pH indikatörleri hidrolizi arasında renk değişimine bağlı bir ilişki kuran testler kullanılmaktadır (Livemiore, 1996).

Direkt testleri sınıflandırsak;

A-Kromojenik Testler:

Nitrosetin testi: Hidrolize bağılı olarak sandan kırmızıya renk değişimi olan Kromojenik sefalosporin testidir.

B-İyodometrik Testler: Penisiloyik asit penisilinin hidroliz ürünüdür ve iyodini indirger. Bunun sayesinde de nişasta-iyodin kompleksi renksizleşir . Bu test 2 değişik şekilde yapılabilir;

- 1) Tüp metodu
- 2) Kağıt strip metodu

C-Asidimetrik Testler: Karboksil grubunu beta-laktam halkasının hidrolizi ortaya çıkartmaktadır (Livermore, 2005). Bu asidite;

- 1) Tüp metodu
- 2) Kağıt strip metodu ile gösterilebilir.

1.4.2.Beta-Laktamaz Aktivitesi İçin İndirekt Testler

1) GSBL Testleri: GSBL saptanmasında, ilk tarama olarak rutin uygulanan antibiyogramlardaki dirençler bizim için yol gösterici olabilirler. İkinci aşamada GSBL varlığının belirlenmesi ve doğrulanması için GSBL'lerin klavulanik asitle inhibe olma özelliğinin aranması gerekmektedir. Bu özelliğın GSBL saptanmasında kullanılacak birkaç yöntemi bulunmaktadır (Yanık, 2003). Bunlar;

- a-Çift disk sinerji testi
- b-E test
- c-kombine disk testi
- d-Otomatize sistemler

2) İndüklenebilir Anı C Testleri (İBL Tayini): Bu enzimleri birinci kuşak sefalosporinler, ampisilin ve amoksisilin indüklerler ve sonucunda bu antibiyotikler enzimlerce yıkılır. Üçüncü kuşak sefalosporinler, sefuroksim (CXM), piperasilin

(PIP) ve aztreonamlar (ATM) ise zayıf indükleyicidirler ve başka bir mekanizma yoksa bu indüklenebilir beta-laktamaz kökenleri duyarlı gözükabilirler. Dereprese mutantlardan ayrı tutulan bu indüklenebilir Amp C yapan organizmalardır(Livemore, 1996). Bu mutantlar hemen hemen bütün penisilinlere ve sefalosporinlere dirençlidirler. Duyarlılık testleri ile üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlılık gösteren İBL içeren kökenler burada en önemli sorunu oluşturur. Bir tedavi hatası ortaya çıkabilmesi için bu ilaçlar kullanıldığı zaman dereprese mutantlar seçilir.

İyi bir bakteri tanımlaması İBL yapan Enterobacteriaceae'leri tanımlamadaki olması gerektir. Sefoksitin (FOX) direncine ve üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı olmasına bakılması en iyi yoldur eğer ki bakteri tanımlanamıyorsa.

Antagonizm testleri ile İBL rutinde de gösterilebilir. Antibiyogramda IPM veya FOX gibi güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisinin yanına, merkezler arası mesafe 1.5-2 cm olacak şekilde ATM veya üçüncü kuşak sefalosporin (CTX, CXM gibi) diski yerleştirilir ve İBL gösterilmesi zayıf olanın inhibisyon zonu güçlü indükleyici tarafından kesintiye uğratılmasıyla olur (Carmeli, 1999).

3) MBL'ların Tayini:

MBL varlığını belirlemek için standardize edilmiş herhangi bir fenotipik yöntem yoktur. Fakat önerilen birtakım testler vardır. Bu önerilen testlerin özgüllük ve duyarlılıkları bakteriye ve belirlenecek enzime göre farklılık göstermektedir. Bu konudaki çalışmalar ise devam etmektedir (Livermore, 2002).

Tayin için önerilen testler;

a- EDTA veya diğer enzim inhibitörü şelatörleri ile CAZ veya IMP arasındaki sinerji testleri

b- Kombine E testler

c- Modifiye Hodge testleridir.

Bu fenotipik yöntemlerin haricinde diğer beta laktamazların tayininde de kullanılan moleküler tekniklerin aynısı MBL belirlemek için de kullanılmaktadır.

1.5.Metallo-Beta Laktamazlar

1.5.1.Metallo-Beta-Laktamazların Sınıflandırılması:

MBL'lar ilk olarak 1980'de serin beta laktamazlardan Ambler'in sınıflandırmasına göre katagorize edilmişlerdir. Bu tablo çıkarıldığı zaman henüz çok az MBL tanımlanmasına rağmen aralarında en çok dikkat çekenler L1 (*S. maltophilia*) ve BCII (*B. cereus*) idi. Bush, fonksiyonel özelliklerini göz önüne alarak MBL'arı 1989'da ayrı bir grup (grup 3) ile sınıflandırmıştır. Genel olarak hala beta laktamazların sınıflandırılması için aktif olarak kullanılan grup da budur (Walsh, 2005). Bu tablo öncelik olarak substrat profilleri (özellikle imipenem hidrolizi), EDTA'ya olan hassasiyetleri ve serin beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmalarına dayanılarak hazırlanmıştır. Tablo ayrıca 1995'te güncellenmiştir. Grup 3 enzimlerinin sürekli büyümesi ve sınıflandırılması da göz önüne alınarak tekrar uyumlu hale getirilmiştir. Tablonun ilk hazırlandığı dönemde MBL'ların sadece 2 transfer edilebilen *Bacteroides fragilis* CcrA ve *P.aeruginosa*" dan elde edilen IMP-1 çalışılmıştır.

Tüm MBL'lar imipenemi hidrolize edebilirler fakat başarabilme güçleri oldukça değişiklik gösterir. Bakterinin direnç düzeyine göre hidroliz oranı, değişiklik gösterebilir veya göstermeyebilir (Bush, 1999). Buna uygun olarak bu enzimlerin sınıflandırılması, öncelikle imipenem ve beta laktam hidrolizi baz alınarak alt gruplara ayrılmıştır (Rasmussen, 1997).

Penisilinleri imipenemden daha hızlı olarak hidrolize edebilenler genellikle alt grup 3a'da bulunan enzimlerdir. Bu grup içerisinde *Bacillus cereus* II, *B.fragilis*' in Cer A, *B.cepacia*' nın PCM-1, *S.maltophilia*' nın L1 enzimleri yanısıra, *S. marcescens*, *P.aeruginosa*, *A.baumannii*, *Shigella flexneri*, *K. pneumoniae* gibi

değişik türlerde saptanan IMP 1-8 (Gülay, 2003; Yano, 2001) ve *P. aeruginosa*'da saptanan VIM 1-3 (Livermore, 2005) enzimleri de yer almaktadır.

Alt grup 3b, *Aeromonas* türlerinin metallo enzimlerini kapsar ve bunlar gerçek karbapenemazlardır. Karbapenemler dışındaki beta-laktamlara etkileri nitrosefin hidrolizine dayanan testlerle gösterilemez çünkü varlıkları çok azdır.

Alt grup 3c *Legionella gormanni* metallo-beta-laktamazlarım içerir. Bu enzim diğer alt gruplardan yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile ayrılmaktadır.

MBL'lar moleküler düzeyde sınıflanması ve standardize edilmesi neredeyse imkansız olan, ayrı bir grup proteinlerdir. Sınıf B enzimlerin, alt gruplara ayrılması yönünde sekans özellikleri ve diğer yapısal özellikleri baz alınarak çeşitli denemeler yapılmıştır (Walsh, 2005). Nukleotid sekans ile bir enzimin diğeri ile alakalı olduğunu Filogenetik şema ile gösterilmiştir. Sınıf B1 rasyonelinde anahtar parça olan çinkonun, 3 histidin ve 1 sistein residüellerini koordine ettiği ve geçiş gösterebilen IMP, VIM, GIM ve SPM-I'e yer sağlamaktadır. Sınıf B2'ler, çinko ile bağlanma bölgesinde asparagin olan bir gruptur ve (SFH-1), aktif bölgesinde NXHXD bulundurmaktadır. (SFH- 1). Sınıf B3'ün tek üyesi MBL L1 üyesi ve tüm beta laktamazlarda fonksiyonel ve tek olan tetramer olarak bilinmektedir (Quirago, 2000)

Kromozomal Olarak Kodlanmış MBL'lar:

Kromozomlarca kodlanan MBL'lar *B. cereus* (BCII), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (L), *Aeromonas hydrophilia* (CphA), *Chryseobacterium meningosepticum* (BlaB veya GOB-1), *Chryseobacterium indologenes* (IND-1), *Legionella gormanni* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (MblIB), *Myroides spp.* (TUS-1, MUS-1) ve *Janthinobactrium lividum* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) VE *S. Fanticola*'ları içermektedir (Walsh, 2005; Rossolini, 2001). Genel olarak kromozomal MBLlar birbirlerinden ufak farklılıklarla

ayrılmaktadırlar. *Chryseobacterium meningosepticum*'un enzimlerindeki farklılık en belirgin belirtilmesi gereken farklılık olarak görülmektedir. Bu nedenle ayrı bir sınıfa ayrılmıştır.

Kromozomlarca kodlanan enzimler, serin beta laktamazlar dışında MBL'ler tarafından da düzenlenmektedir. Örneğin penisilinaz, sefalosporinaz ve MBL olmak üzere 3 çeşit beta laktamaz *Aeromonas hydrophilia* ve *A. veronii biovar sobia* üretmektedir. Bunların hepsi yüksek derecede beta laktam direnci olan mutantların (dereprese mutantlar) seçildiği sırada fazlaca eksprese olmaktadır. *Bacteroides spp.*'lerde görülen bir grup MBL transfer edilebilir özelliktedir ancak kromozomal olarak tanımlanmıştır. Diğer anaerobik bakterilerle karşılaştırılacak olursa, CfiA ve CcrA'ya bağlı olarak nisbeten beta laktamlara dirençlidir (Thompson, 1990).

Bazı bakteriler doğal çevrede de MBL taşımaktadır. Taşımalarının sebebiyle alakalı birçok görüş vardır. Bir görüş bu enzimlerin hücresel bir fonksiyonu yerine getirmek için oldukları yönünde iken, diğer bir görüş ise doğada bu bakterilerin belirli bir süre beta laktam ve beta laktam tipi bileşiklere maruz kalmaları doğrultusundadır.

MBL'ların Biyokimyası:

Beta laktam halkalarının amidlerinin bağlanma noktasına serin beta laktamazlar ve MBL'ların ikisi de etki ederler ancak bu işi farklı şekillerde yaparlar. MBL'lar aktif yapıyı belirleyen bir aminoasite etkiler ki bunun sonucu çinko iyonları düzenlenmiş olur. Genellikle çinko bağlanma motifi histidin-X-histidin-X-aspartik asit (HXHXD) şeklinde olanlar Sınıf B2 enzimleri dışında kalan MBL'lerdir. Çinko iyonu tercih edilen iyonudur. Sınıf B2'de 1 çinko iyonu bulunur

fakat birçoğunun aktif bölgesinde 2 çinko iyonu bulunur. (Walsh, 2005; Spencer, 2001).

MBL'ların hidroliz metabolizması farklı MBL'lar arasında farklılıklar göstermektedir ve oldukça karmaşıktır (Docquier, 2003) MBL'ın katalitik yapısının anlaşılmasında kristal yapısının bilinmesi bayağı yardımcı olmaktadır (Concha, 2000).

Serin beta laktamazlardan farklı olarak MBL'lar geniş bir aktif bölgeye sahiplerdir ve bununla alakalı olarak da beta laktamlar için uygun bölge oluşturmaktadırlar. MBL'lar sulbaktamdan ve zayıf substratlar olan ve serin inhibitörleri olarak bilinen klavulanik asit etkilenmezler. Aztreonamı hiçbir MBL tam olarak hidrolize edemez, bu nedenle aztreonam, terapötik bir MBL inhibitörü olarak düşünülmektedirler. Ancak hayvanlar üzerine yapılan bir çalışmada VIM-2 üreten *P. aeruginosa'nın* neden olduğu pnömonilerde yüksek dozda aztreonam verilmesinin enfeksiyonu eradike edemediği izlenmiştir (Bellais, 2002).

Bu enzimler, beta laktamlara bağlanma ve hidroliz etme özelliklerinde çok çeşitlilik göstermektedirler ancak aktif bölgelerinde ve kıvrımlarında ortak noktalar da barındırırlar. Bu duruma en iyi örnek yapısal olarak birbirine çok yakın olan VIM-1 ve VIM-2'dir. Ancak beta laktamlara VIM-2, VIM-1'e göre daha sıkıca bağlanır. Beta laktamları hidrolize etmeleri bakımından SPM-1, IMP-1 için ampisilin, imipenem ve moxalaktamları bunlardan ayrı tutarsak, IMP-1 VE GIM-1'e göre daha etkilidir. Penislin ve karbapenemlere kıyasla SPM-1 sefalosporinlere daha iyi bağlanır. GIM-1, dar spektrumlu sefalosprin ve karbapenemlere penislinaz aktivitesi ile etki etmektedir (Walsh, 2005).

TRANSFER EDİLEBİLİR MBL'LAR

IMP Tipi MBL'lar :

İlk olarak Japonya'da 1988'de *P.aeruginosa* kökenlerinde hareketli (mobile) MBL'lar bulunmuştur. Yine Japonya'daki (Okazaki) bir hastanede 3 yıl sonra aynı gen *S. marcescens* kökenlerinde Tn9106 izolatında gösterilmiştir . Okazakiye çok yakın bir hastanede 2 yıl sonra aynı gene *S. marcescens*'de rastlanılmıştır (Arakawa, 1995). Bu IMP-1 alleli (blaIMP) geniş bir plazmidin üzerinde aac(6')Ib-ye benzer gene çok yakın olan sınıf 3 integron içinde bulunmuştur.

Japonya'daki 5 hastanede 1993'de yapılan bir çalışmada blaiMP taşıyan 4 adet *S. marcescens* bulunmuştur. Japonya'daki 15 hastanede 1992-1994 yılları arasında 3700 *P. aeruginosa* ile yapılan hibridizasyon çalışmasında , 5 hastaneden toplam 15 köken blanvip-1 yönünden pozitif bulunmuştur. Fakat bu pozitif olanların IMP MİK değerine bakıldığında enterasan bir şekilde değerlerin 2mg/l- 128mg/l arasında değiştiği görülmüştür.

Japonya'da CAZ'e dirençli olan 54 izolat ile yapılan bir çalışmada 22 blaiMP-1 geni taşıyan kökenler polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile gösterilmiştir.

Shigella flexneri, *S. marcescens*, *P.aeruginosa* ve *Alcaligenes spp.* kökenleri ile yine Japonya'da yapılan çalışmada IMP-T in minör varyantları olan IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tanımlanmıştır. IMP-3 *S. flexneri* de gösterilmiştir ve bu IMP-1'den yalnız 2 aminoasit farklılığı vardır. Genetik ve kinetik çalışmalar, 196. pozisyona giysin yerine serin eklenmesinin, penisline karşı aktivitede azalma ile sonuçlandığını göstermiştir. Aynı aminoasit değişikliği IMP-6'da da gözlenmesine rağmen burada sadece penislin G'ye karşı aktivite azalması ile kalmamıştır. Aynı zamanda IMP ve piperasiline göre MEM hidrolizinde artışa sebep olmuştur.

P. aeruginosa ve *Alcaligenes spp.* izolatları 1995-2001 tarihleri arasında toplanmıştır ve yapılan çalışmalar sırasında IMP-10 keşfedilmiştir.

MBL'ların atası sayılan BCII'de IMP-3 ve IMP-6 'daki gen değişimlerinin de görülmesi, IMP-3'ün IMP-1'in varyantı olmasından ziyade IMP-3'ün IMP-1'in atası olabileceği hipotezini ortaya koymuştur (Walsh, 2005).

BlaVIP-10 geni *P.aeruginosa'* lann bir izolatında kromozomal kökenli, bir tanesinde ise plazmid aracılı olduğu bulunmuştur. 49. Pozisyonda valin yerine fenilalanin gelmesine sebep olan tek baz değişikliği ile blaIMP-10 ve blaVIP-1 genleri birbirinden ayrılmaktadır. 1997'de blaIMP-2, 1998'de blaIMP-5 sırasıyla İtalya ve Portekiz'de de MBL genleri görülmüştür (78) ancak İlk başlarda MBL genlerinin sadece Japonya'da problem oluşturduğu düşünülmüştür.

IMP-2, IMP-5 17 aminoasit değişikliği gösterirken, IMP-1'e göre 36 aminoasit farklılığı göstermektedir. İkisi arasında da genetik çeşitlikler mevcuttur. 2 ayrı IMP varyantı İtalya'da bu raporları takiben tanımlanmıştır. IMP-12 50- kb'lık transfer edilemeyen bir plazmidde bulunmaktadır ve 36 aminoasitle IMP-1'den ayrılarak düşük penislin aktivitesi göstermektedir. Diğeri ise 19 aminoasit farklılığı ile IMP-T den ayrılan blaIMP-13 İtalya'da bulunmuştur ve kromozomlarca kodlandığı bildirilmiştir (Docquier, 2003).

İngiltere'de yakın zamanda *A. baumannii* ve *A. junii* kökenlerinde IMP-1 genini göstermişlerdir. Bulunan *A.junii* kökeninin İspanya'da tatilde olan ve İngiltere'ye dönmeden önce, 4 hafta gibi süre oradaki hastanede kalan kadın hastadan izole edildiği bildirilir fakat genetik açıdan detaylı bilgiler henüz tam anlamıyla açıklığa kavuşmamıştır. Hong Kong ve Kanada'da 1994 ve 1995 yıllarında IMP-4 ve IMP-7 tanımlanmıştır. 1994-1998 yılları arasında MBL geni olan blaIMP-4, imipeneme dirençli kökenlerin %66'sında ortaya çıkarılmıştır (Chu, 2001). Acinetobacter kökenlerinin %14 prevalans ile IMP-4 enzimini taşıdıkları tespit edilmişken, 1999 yılında nedeni bilinmeyen bir sebeple ortadan kaybolmuşlardır. Daha sonraları 2000'li yıllarda Çin'de, *Citrobacter youngae* ve *P.aeruginosa'* larda ortaya çıkmıştır.

IMP-7 klonal *P.aeruginosa* Canada'da salgınına yol açmış, IMP-8 Taiwan'da bulunmuştur. IMP-8, IMP-1'e kıyasla IMP-2'ye daha benzer bulunmuştur (Gibb, 2002). İlerki safhalardaki çalışmalarda MBL üreten izolatların Japonya'dan dünyaya yayılmış olduğu düşünülse de bu konuda yeterli bilgi elde edilememiştir. Genetik veriler bu konu için yetersiz kalmıştır. İki çalışmada Kore'de yapılan MBL'ler yüzünden karbapenem direnci ile ilgili ciddi sorunların ortaya çıktığı görülmüştür. 130 karbapenem veya seftazidime dirençli izolatın %35'inde IMP benzeri MBL genlerinin taşındığı tespit edilmiştir. İmipenem direnci 1996'da %6 iken, 2001'de %19'a yükselmiştir. Dünya çapındaki SENTRY çalışmasında Brezilya'dan 5 tane IMP-1 ve yeni bir IMP olan IMP-16 tanımlanmıştır. New Mexico'da *P.aeruginosa*'da IMP-18 bulunmuştur (Hanson, 2004).

VIM Tipi MBL'lar:

VIM- tipi enzimler kazanılmış MBL'ların ikinci temel grubudur. VIM-1 *P.aeruginosa* izolatında İtalya'da, Verona'da bir tanımlanmıştır. 1997'de elde edilen bu klinik izolat piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonamı kapsayan çeşitli beta laktamlara dirençli bulunmuştur. Özellikle İmipenem MİK değerinin >128j.1g/ml olduğu görüldü.

Biyokimyasal analiz, EDTA ile inhibe olan ve Zn^{+} eklenmesiyle yeniden kazanılan karbapenem hidrolizi gösteren bu kökenin kaba ekstresinden yapıldı. Bu gözlemler bir metallo enzim üretimini düşündürmüştür. Beta laktamaz geni klonlanmış ve diğer MBL'lardan uzaktan ilişkili olan VIM (Veronese imipenemaz) ortaya konmuştur. Sadece %39 aminoasit ortaklığı olan BCII daha yakın ilişkide olduğu bulunmuş, daha sonra aztreonam dışındaki çoğu beta laktamı hidrolize eden tipik B sınıfı enzimi olan VIM-1'in hidrolitik profili analiz edilmiştir.

BlaIMP gibi blaVIM geni de sınıf 1 integron içindeki bir gen kasetindedir (Laurettil, 1999). Bu integron, sınıf 1 integronların tipik bir integraz genini ve blaviM gen kasedine ek olarak, aminoglikozid direnci kodlayan bir aacA4 gen kasedini taşımaktadır. Sonrasında, bir blaviM-1 geni Verona'daki aynı hastanede

Achromobacter xylosoxidans'ta bulundu. Karbapenemler dahil bütün beta laktamlara direnç göstermekteydi, gen kasetinin aşağı bölgesinde yer alan 3 farklı aminoglikozid direnç geni içermekteydi.

VIM-1, çevresel izolatların MBL'ler için kaynak yada en azından vektör olduklarını vurgularcasına İtalya'da bir nozokomiyal infeksiyon kaynağı olarak klonal ilişkili üç *P.putida* izolatında saptanmıştır.

VIM-1 çeşitli *K. pneumoniae* izolatlarında ve *E. coli*'de Yunanistan'da saptanmıştır. Benzer bir VIM-1 pozitif *K. pneumoniae* kökeni yakın zamanda Fransa'da GSBL SHV-5 ile ilişkili olarak bulunmuştur.

İlk olarak 1996'da Fransa'nın güneyinde nütropenik bir hastanın kan kültüründeki *P. aeruginosa* izolatında BlaVIM-2 saptanmıştır (Walsh, 2005). Aztreonama duyarlı iken Çoğu beta laktama dirençli kalmıştır. VIM-1 ve VIM-2 arasında %90 aminoasit ortaklığı söz konusudur. Dizi heterojenliği VIM-1 ve VIM-2'nin çoğunlukla NH2 ve karboksi terminal bölgelerinde görülmektedir. Sonrasında, Fransa ve Paris'te aynı blaVIM-2 gen kasetini taşıyan 2 adet *P. aeruginosa* izolatı tanımlanmıştır. Her iki izolatın da *P. aeruginosa*'nın COL-1 izolatıyla karşılaştırıldığında aztreonam dışındaki tüm beta laktamalara yüksek düzeyde dirençle benzer direnç paternlerine sahip olduğu görülmüştür. Bu iki izolatta blaVIM-2 gen kasetleri farklı sınıf 1 integronlar içine yerleşmiştir (Walsh, 2005).

Benzer şekilde İtalya ve Yunanistan'da salgın kaynağı VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları olarak bulunmuştur . Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polanya, Hırvatistan, Şili, Venezuela, Arjantin, Belçika ve yakın zamanda ABD'lerinden de VIM-2 üreten *P. aeruginosa* izolatları bildirilmiştir (Walsh, 2005).

Son zamanlarda VIM-3 VIM-2 ve VIM serisinin varyantı Taiwan'da *P.aeruginosa* izolatlarında tanımlanmıştır. 2 aminoasit değişimi ile VIM-2'den ayrılmaktadır.

Yunanista'da VIM-4 bir *P.aeruginosa* izolatında bildirilmiştir. Bu köken daha önce imipenem kullanmış bir hastadan elde edilmişti ve bu da beta laktamlara dirençli iken, aztreonama karşı aktivitesini korumaktaydı. İsveç'te de VIM-1'den 1 aminoasit değişikliği ile ayrılan VIM-4 üreten, *P.aeruginosa* izolatı tanımlanmıştır ancak izolatın Yunanistan'dan gelen bir hastadan olduğu görülmüştür (Giske, 2003). İtalya'da Mayıs 2002'de *E. cloacae* ve *K. pneumoniae* izolatlarında aynı MBL geni saptanmıştır. Bu hasta VIM üreticilerinin seçilimine katkıda bulunması olası olan karbapenem içerikli tedavi almıştır. Bu izolatların imipenem, meropenem minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin sırasıyla 0,25 ve 0,12j.1g/ml ile 2 ve 0,5} .1g/ml olduğu görülmüştür.

BlaVIM-4 'ün bu iki izolatta da aynı plazmid tarafından kodlandığı halde karbapenem MİK düzeylerinin çeşitliliği oldukça ilginç karşılanmıştır. Polonya'da yürütülen bir çalışmada klonal olarak ayrı çeşit VIM-4 üreten *P.aeruginosa* kökenleri olduğunu göstermiştir (Patzner, 2004).

VIM-5, VIM-1'den 5 aminoasit değişikliği ile ayrılmaktadır. Türkiye'de *P.aeruginosa*'da tanımlanan VIM-5 *K.pneumoniae*'da da tanımlanmıştır. *P.aeruginosa* kökeninin azteronam dahil tüm beta laktamlara dirençli olduğu görülmüştür.

VIM-6 Singapur'da *P. putida* izolatında tanımlandı. Beta laktamlara yüksek düzeyde dirençliydi (Koh, 2004).

VIM-7 Texas'da karbapeneme dirençli bir *P.aeruginosa* gösterildi VIM-1 ile %77i, VIM-2 ile %74 benzerlik göstermektedir. Bu yüzden VIM tipi MBL'lar arasında 3. bir grup oluşturur. BlaVIM-7 aztreonam ve polimiksin B hariç tüm diğer antibiyotikler ve beta laktamlara dirençli bir kökende bulunmuştur. MBL verilerinde yeni blaVIM genlerinin çeşitli dizileri sunulmuştur ancak resmen yayınlanmamıştır.

VIM-8, VIM-9, VIM 10 ve VIM-1 1 enzimleri de çeşitli izolatlarda yakın zaman içinde gösterilmiştir (Bush, 1999).

SPM-1 Tipi MBL'lar:

1997'de Sao Paulo, Brezilya'da SENTRY sürveys programı dahilinde olarak bir klinik *P. aeruginosa* kökeninde tanımlanmıştır. 4 yaşındaki bir lösemi hastasının kanından izole edilmiştir. Bütün anti Gram negatif antibiyotiklere dirençli bulunmuştur fakat Aztreonam ve kolistin dışındaki. (Gales, 2003).

SPM-1 diğer MBL'ler ile kıyaslandığında benzerlikler, IMP-1 ile %35,5, ImiS ile %32,2, BCII ile %30 olduğu görülmüştür. IMP ve VIM'den önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Aktif bölge HFHLD'den sonra gelen, 24 aminoasitlik bir insersiyon bulunmaktadır. Bu insersiyonun beta laktamları hidrolize eden bir halka olarak çalıştığı gösterilmiştir. blaSPM-1'in genetik içeriği tektir, transpozonlarla ya da integronlarla ilişkili değildir. IMP-1 ve VIM-1'deki gibi SPM-1 de klavulanik asit ya da aztreonamı hidroliz etmez, yarışmacı inhibitör olarak çalışır. Sefalosporinlere penislinlerden daha sıkı bağlanır (Walsh, 2005).

GIM-1 Tipi MBL'lar:

Almanya'da 5 farklı hastadan 2002'de elde edilen *P.aeruginosa* izolatlarında GIM-1 (German imipenemaz) olarak tanımlanan sınıf B beta laktamaz üretilmiştir. Bu 5 izolat da polimiksine duyarlı bulunmuştur. GIM-1'in aminoasit sekanslarına göre en çok benzerlik IMP- varyantlarından olan IMP-6, IMP-1, IMP-4 ile; VIM varyantlarından ise VIM-4, VIM-5, VIM-1 ve VIM-7 ile gösterilmiştir (Walsh, 2005).

GIM-1 MBL sınıf B1 ailesine uygun olarak 2 çinko bağlayan HXHXD motifi aktif bölgesinde bulundurmaktadır. GIM-1 daha zayıf olan bir enzimdir ancak IMP-1'e benzer şekilde hidrolitik bir enzimdir. 3 farklı direnç genini Sınıf 1 integron üzerinde barındırır.

1.6. Metallo-beta-laktamazların Tespit Edildiği Yöntemler

1.6.1. Kombine Disk Testi

MBL varlığının İnhibisyon zon çapı farkına bakılarak araştırıldığı bir yöntemdir. Aynı plak yüzeyine 2 imipenem diski ki bu disklerinin arasında 22mm olarak yerleştirilerek bir tanesinin üzerine EDTA solüsyonu eklenir. Test pozitif kabul edilmesi için EDTA'lı imipenem diskinin inhibisyon zon çapı tek başına imipenem diski zon çapından ≥ 7 mm olması gerekir. Uygulanması ve yorumlanmasının kolay olması bu testin avantajıdır. Bu avantajlarının yanında yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlarda bildirilmiştir (Yong, 2002).

1.6.2. Çift Disk Sinerji Testi

2000 yılında Arakawa ve ark.(Arakawa, 2000) seftazidim dirençli suşlarda seftazidim-MPA (merkaptopropionik asit), seftazidim-SMA (Sodyum merkaptopropionik asit), imipenem-EDTA+SMA diskleriyle bu testi uygulamışlardır ve bu iki disk arasındaki inhibisyon zonunun artmasını pozitif olarak yorumlamışlardır. 2001 yılında Lee ve ark.(Lee, 2003) imipenem dirençli suşlarla imipenem ve EDTA diski kullanarak bu testi yapmışlardır. İki disk arasındaki inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilmiş ve bu durumda test pozitif olarak yorumlanmıştır. 2004 yılında Yan ve ark.(Yan, 2004) tarafından seftazidim ve seftazidim+klavulanik asit, sefepim ve sefepim+klavulanik asit diskleri Mueller-Hinton agar plağının kenarlarına yerleştirilmiştir ve sonra plağın ortasına MPA, EDTA ve SMA diskleri yerleştirilerek bu testi yapmışlardır. Pozitif sonuç olarak yorumlanması için şelatör madde içeren diskler ile herhangi bir disk arasındaki inhibisyon zonunun artması gözlenmelidir. Bu yöntemle imipenem duyarlı suşlarda da MBL taranabilmiştir.

1.6.3. MBL E-Test Yöntemi

Test sribinin kullanılarak bir tarafında imipenem diğer tarafında ise imipenem ve EDTA bulunan yapıldığı testtir. MBL pozitifliği olarak değerlendirilmesinde EDTA'nın olduğu taraftaki MİK değerinin imipenem MİK değerinden ≥ 8 olması gereklidir(Yan, 2004). MBL E-test şeritleri bakteriyoloji laboratuvarlarında fenotipik yöntemlerden kolay uygulanabilir olmasından nedeniyle kullanılabilir. Düşük düzeydeki dirence bağlı olarak yanlış negatif sonuç verebilmesi bu yöntemin dezavantajıdır(Lee, 2005).

1.6.4. Modifiye Hodge Testi

Bu test penisilinaz üreten *Neisseria gonorrhoeae* tespitinde kullanılan Hodge testinin modifiye edilmesiyle oluşturulmuştur. Hodge testinde kullanılan *S. aureus* (ATCC 25923) yerine *E. coli* (ATCC 25922) ve penisilin diski yerinede imipenem diski kullanılarak yapılmaktadır. İmipeneme duyarlı *E. coli* suşu MBL üreten bir bakteri ile bir arada bulunduğu imipeneme rağmen üreyebilir. Bu durumda test pozitif kabul edilir.(Lee, 2001)

1.6.5. Mikrodilüsyon Yöntemi (MDT)

2002 yılında Migliavacca ve ark.(Migliavacca, 2002) tarafından geliştirilmiştir. Test edilen suşun imipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenir sonra metal şelatörlerden EDTA ile tekrar MİK değerlerine bakılır. Pozitif olarak yorumlanabilmesi MİK değerleri arasında sekiz kat azalma görülmelidir. Bakteriden saflaştırılan enzimin spektrofotometrik olarak imipenem ve meropenem hidrolizinin gösterilmesi fenotipik yöntemlerden “altın standart” olarak tanımlanan duyarlılığı en yüksek olan testtir (Urban, 2003).

1.6.6. Genotipik MBL Tespit Yöntemleri

MBL'lerin tespitinde fenotipik yöntemlerden genotipik yöntemlerin duyarlılığı daha yüksektir. Bu yöntemler aşağıdaki gibi sıralanır;

1. Polimeraze chain Reaction (PCR)
2. DNA prob yöntemi
3. Klonlama ve sekanslama yöntemi (Altın standart)

Polimerane chain Reaction (PCR): Belirli primerler kullanılarak bir izolatta MBL geni olup olmadığı PZR uygulanarak belirlenebilir bunun yanında her enzime özgül primerler kullanılarak enzim tipini saptamak da mümkündür (Walsh, 2005).



3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına 2017-2018 yılları arasında çeşitli servislerdeki hastalardan gönderilen ve klinik örneklerden izole edilen, imipenem (IMP) ve/veya meropenem (MEM)'e dirençli toplam 54 *A.baumannii*, 40 *P. aeruginosa* suşu bu çalışmaya dahil edildi. *A.baumannii* izolatu en fazla anestesizi yoğun bakım servisinden *P.aeruginosa* izolatu ise en çok beyin cerrahi yoğun bakım servislerinden gönderilen örneklerden elde edilmiştir. Laboratuvara gönderilen kan, beyin omirilik sıvısı (BOS), idrar, balgam, yara yeri sürüntüsü gibi örnekler kültürü yapılmak üzere kanlı agar (BioMérieux, Fransa), çikolatamsı agar (BioMérieux, Fransa) ve Eosin Methylene Blue (EMB) (BioMérieux, Fransa) agar besiyerlerine ekildi. *A.baumannii* en fazla trakeal aspirat klinik örneğinden, *P. Aeruginosa* izolatu da en çok yine trakeal aspirat klinik örneklerinden elde edilmiştir. 35-37°C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı. Her hastadan tek bir örnek çalışmaya dahil edildi. İzolatların tür düzeyinde tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık testleri konvansiyonel kültür yöntemlerinin yanısıra VITEK 2 Compact® (BioMérieux, ABD) otomatize sistemi ve gradient strip testi ile "The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)" kriterlerine göre değerlendirildi.

Çalışma için Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 02.02.2018 tarih ve 2018/2-60 toplantı numaralı etik kurul onayı alınmıştır.

3.2. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri

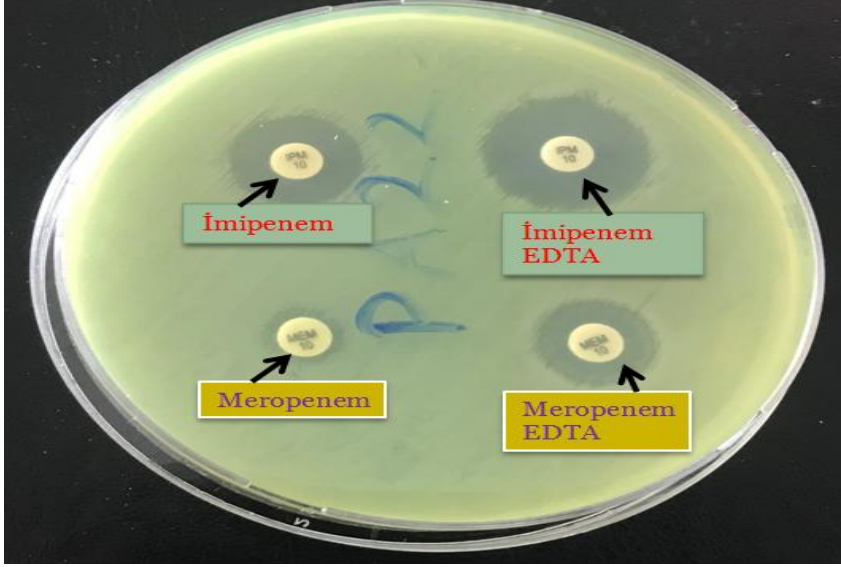
Bu çalışmada; amikasin, piperasilin/tazobaktam, piperasilin, trimetoprim/sülfametaksazol, seftazidim, gentamisin, aztreonam, tobramisin, siprofloksasin, levofloksasin, imipenem, meropenem, sefepim, kolistin ve tigesiklin antimikrobiyal ajan olarak kullanıldı. Duyarlılık testleri çalışılincaya kadar suşlar %15 gliserol eklenmiş triptik soy broth içeren 2 ml'lik steril ependorf tüplerinde - 80°C'de muhafaza edildi.

EUCAST önerilerine göre disk difüzyon yöntemi ile imipenem (IPM) (10 mg) veya meropenem (MEM) (10 µg) diskleri (BioMérieux) etrafındaki inhibisyon zon çapları < 16 mm olan *P.aeruginosa* için (≤ 3 mm. dirençli, 14-15 mm.orta derecede duyarlı) *A.baumannii* için (≤ 13 mm. dirençli, 14-15 mm.orta derecede duyarlı) olan suşlar çalışmaya alındı. Bu suşlardaki direnç, E test yöntemi (BioMérieux, Fransa) ile imipenem ve meropenem için MİK tespit edilerek (MİK değeri ≤ 4 mg/ml duyarlı, ≥ 16 mg/ml dirençli) doğrulandı. Tüm suşların karbapenem duyarlılıkları her iki yöntemle de uyumlu sonuçlar verdi. Kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 kullanıldı.

3.3. Metallo-Beta-Laktamaz (MBL) Aktivitesinin Belirlenmesi:

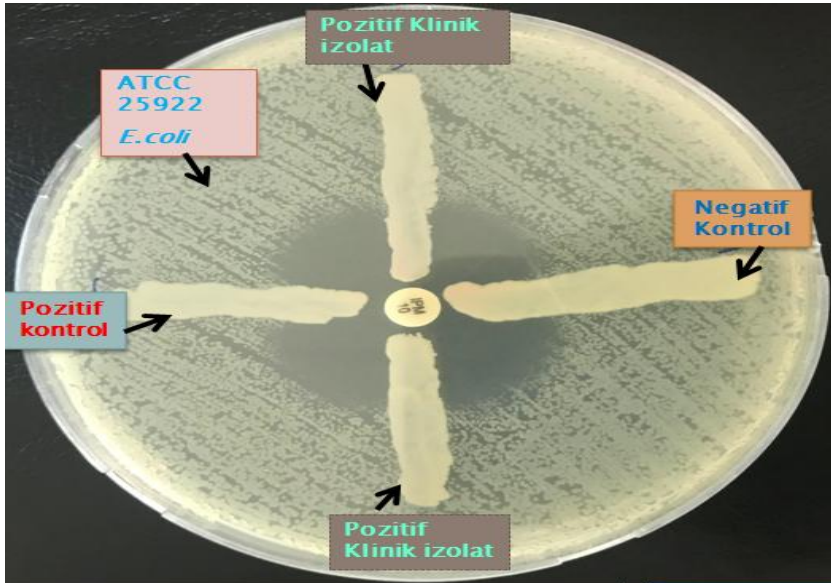
Karbapenemlere dirençli veya azalmış duyarlılığı olan suşların karbapenemaz ve MBL üretimi modifiye Hodge testi ve İMİPENEM-EDTA / MEROPENEM-EDTA disk yöntemi ile tarandı.

İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Disk Yöntemi (Kombine Disk Testi-KDDT): Çalışmanın başlangıcında EDTA stok solüsyonu hazırlandı. Bunun için, 1000 mL distile suda 186,1 g disodyum EDTA.2H₂O (Sigma, Almanya) çözdürülerek 0,5 M EDTA solüsyonu elde edildi ve NaOH ile pH 8,0'e ayarlandı daha sonra otoklavlanarak sterilize edildi. 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu müller hinton agara ekildi. İki adet imipenem ve meropenem diski (10µg) aralarında en az 22 mm olacak şekilde besiyeri yüzeyine yerleştirildi, imipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 µl EDTA eklendi. 35⁰C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları ölçüldü (Şekil 1). Her iki karbapenem diskleri için ayrı ayrı etraflarındaki zon çapları ile bu disklerin EDTA ile kombine edildiği disklerin etrafındaki zon çapları arasındaki fark her bir suş için kaydedildi. İmipenem ve meropenem diskleri zon çapları, EDTA'lı disklerin zon çaplarından 7 mm'den daha az ise pozitif kabul edildi.



Şekil 1. İmipenem-EDTA ve meropenem-EDTA disk örnekleri

Modifiye Hodge Testi (MHT): *E.coli* ATCC 25922 suşunun McFarland 0,5 bulanıklığındaki süspansiyonu hazırlanarak Mueller Hinton agar plağının yüzeyine ekildi. Plağın merkezine imipenem diski (10 mg) yerleştirildi. Test suşları, bu diskin dört bir kenarından periferine doğru çizgi ekimi şeklinde öze ile ekildi. 35⁰C’de 24 saatlik inkübasyondan sonra diskin etrafındaki inhibisyon zonunda yonca görünümü pozitif olarak kabul edildi (Şekil 2).



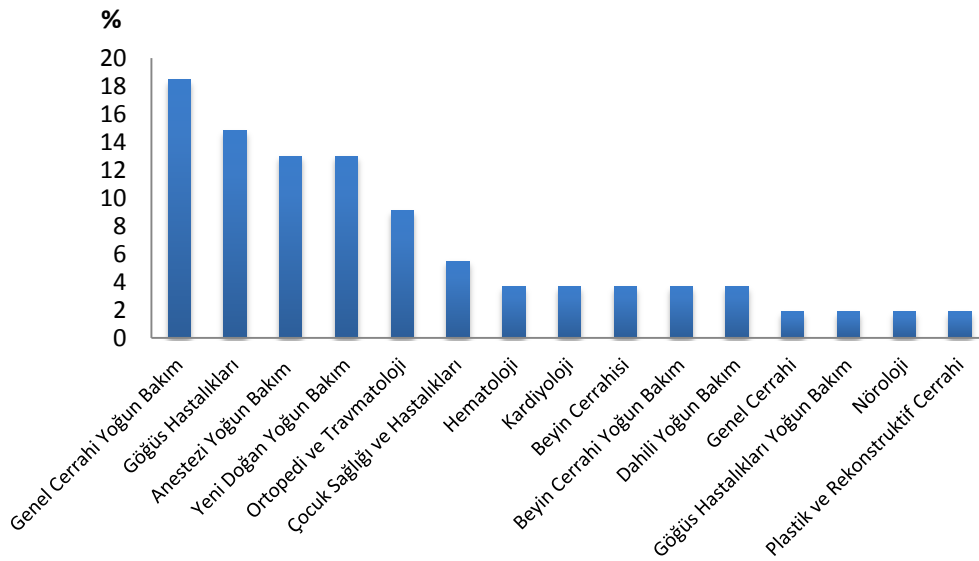
Şekil 2. Modifiye hodge testi; pozitif ve negatif örnekler.

4. BULGULAR

Çalışmaya bir yıllık süre içerisinde toplanan ve belirtilen koşullara uygun olan 40 P. aeruginosa ve 54 A.baumannii suşu dahil edilmiştir. A.baumannii izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı tablo 4.1’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. A.baumannii izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı

Servis	Sayı	%
Anestezi Yoğun Bakım	7	13
Beyin Cerrahisi	2	3,7
Beyin Cerrahi Yoğun Bakım	2	3,7
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	3	5,5
Dahili Yoğun Bakım	2	3,7
Genel Cerrahi	1	1,9
Genel Cerrahi Yoğun Bakım	10	18,5
Göğüs Hastalıkları	8	14,8
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	1	1,9
Hematoloji	2	3,7
Kardiyoloji	2	3,7
Nöroloji	1	1,9
Ortopedi ve Travmatoloji	5	9,1
Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi	1	1,9
Yeni Doğan Yoğun Bakım	7	13
Toplam	54	100

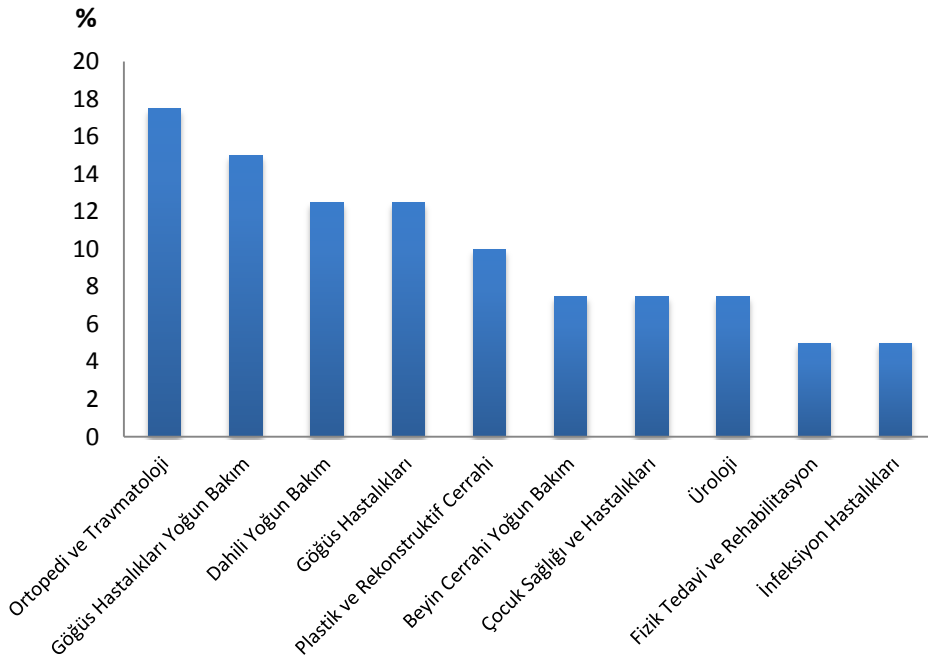


Şekil 3. A.baumannii izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı.

P.aeruginosa izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. *P.aeruginosa* izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı

Servis	Sayı	%
Beyin Cerrahi Yoğun Bakım	3	7,5
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	3	7,5
Dahili Yoğun Bakım	5	12,5
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2	5
Göğüs Hastalıkları	5	12,5
Göğüs Hastalıkları Yoğun Bakım	6	15
İnfeksiyon Hastalıkları	2	5
Ortopedi ve Travmatoloji	7	17,5
Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi	4	10
Üroloji	3	7,5
Toplam	40	100

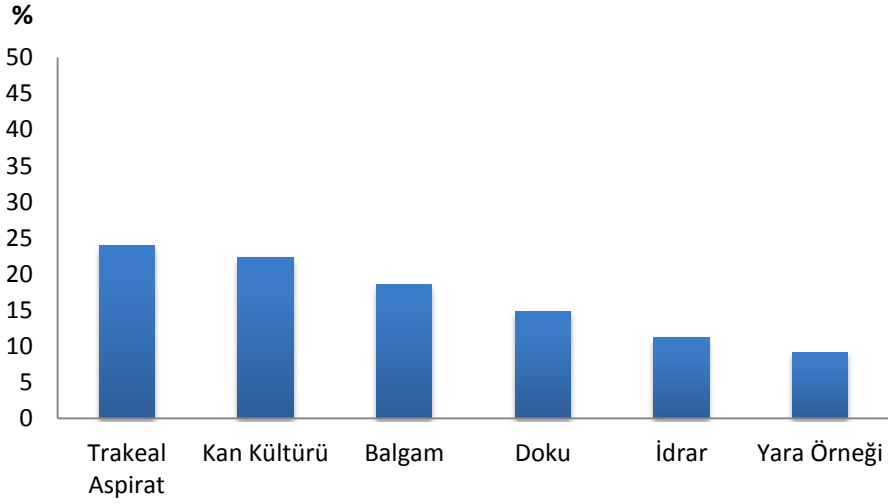


Şekil 4. *P.aeruginosa* izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı

A.baumannii izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılımı Tablo 4.3'te verilmiştir.

Tablo 4.3. A.baumannii izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	%
Balgam	10	18,5
Doku	8	14,8
İdrar	6	11,2
Kan Kültürü	12	22,3
Trakeal Aspirat	13	24
Yara Örneği	5	9,2



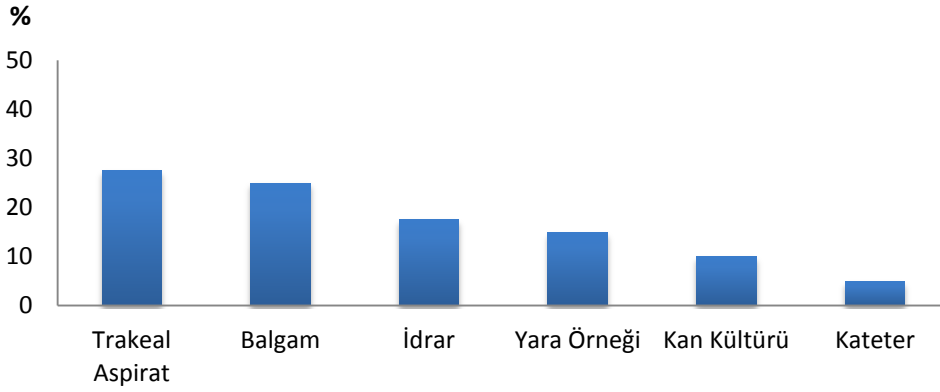
Şekil 5. A.baumannii izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı

P.aeruginosa izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılımı Tablo 4.4'te verilmiştir

Tablo 4.4. P.aeruginosa izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	%
--------------	------	---

Balgam	10	25
Kateter	2	5
İdrar	7	17,5
Kan Kültürü	4	10
Trakeal Aspirat	11	27,5
Yara Örneği	6	15

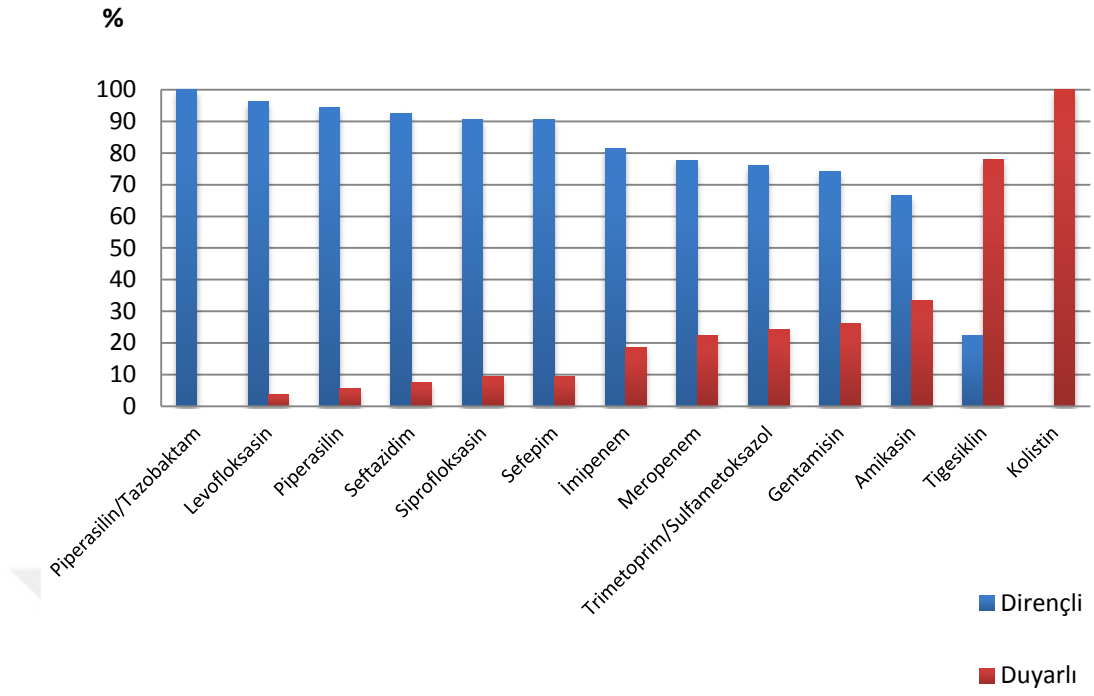


Şekil 6. *P.aeruginosa* izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımı

A.baumannii ve *P.aeruginosa* suşlarının duyarlılıkları VITEK 2 (BioMérieux, ABD) otomatize sistemi ile saptanmıştır. Dirençli suşlar E test metodu ile doğrulanmıştır. Çalışmaya alınan *A.baumannii* izolatlarının antibiyotik direnç profili Tablo 4.5'te verilmiştir.

Tablo 4.5. *A.baumannii* suşlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	Dirençli Suş Sayısı	%
İmipenem	44	81,5
Meropenem	42	77,7
Amikasin	36	66,6
Gentamisin	40	74
Levofloksasin	52	96,3
Siprofloksasin	49	90,7
Kolistin	0	0
Piperasilin	51	94,4
Piperasilin/Tazobaktam	54	100
Tigesiklin	12	22,2
Trimetoprim/Sulfametoksazol	41	75,9
Sefepim	49	90,7
Seftazidim	50	92,6

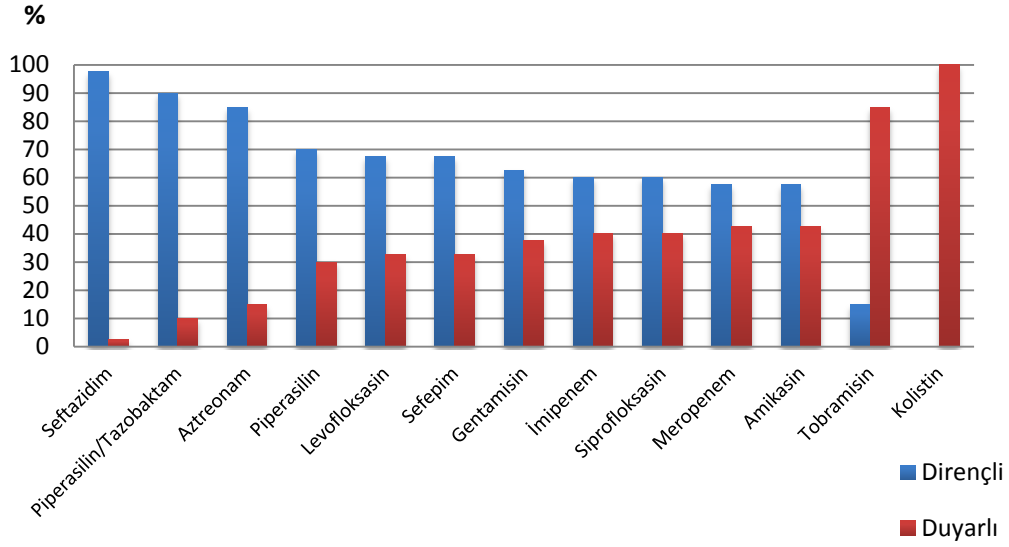


Şekil 7. *A.baumannii* suşlarının antibiyotik direnç profilleri

P.aeruginosa izolatlarının antibiyotik direnç profili Tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profilleri

Antibiyotik	Dirençli Suş Sayısı	%
İmipenem	24	60
Meropenem	23	57,5
Amikasin	23	57,5
Gentamisin	25	62,5
Levofloksasin	27	67,5
Siprofloksasin	24	60
Kolistin	0	0
Piperasilin	28	70
Piperasilin/Tazobaktam	36	90
Sefepim	27	67,5
Seftazidim	39	97,5
Aztreonam	34	85
Tobramisin	6	15



Şekil 8. *P.aeruginosa* suşlarının antibiyotik direnç profilleri

Çalışmamızda 40 *P.aeruginosa* suşunun 5 (%12.5)'i MHT ile, 21 (%52.5)'i imipenem-EDTA disk testi ile 23 (% 57.5)'ü meropenem-EDTA disk testi ile pozitif olarak tespit edilmiştir. 54 *A.baumannii* suşunun 43 (% 84.3)'ü MHT ile, 35 (% 68.6)'i imipenem-EDTA disk testi ile 46 (% 90.2)'sı meropenem-EDTA disk testi ile pozitiflik olarak bulunmuştur. Fenotipik testler içinde en yüksek pozitiflik oranı *A.baumannii*'de imipenem-EDTA disk testi (% 90.2) ve *P.aeruginosa*'da meropenem-EDTA disk testi 23 (% 57.5) yönteminde görülmüştür. En az pozitiflik oranı *A.baumannii* için imipenem-EDTA disk testi (% 68.6) iken *P.aeruginosa* için MHT (%12.5) olmuştur. Testlerin pozitiflik oranları Tablo 4.7'de gösterilmiştir.

Tablo 4.7. Fenotipik testlerin pozitiflik oranları.

	<i>P.aeruginosa</i>			<i>A.baumannii</i>		
	MHT (%)	İmipenem-EDTA (%)	Meropenem-EDTA (%)	MHT (%)	İmipenem-EDTA (%)	Meropenem-EDTA (%)
Pozitif	12,5	52,5	57,5	84,3	68,6	90,2
Negatif	87,5	47,5	42,5	15,7	31,4	9,8

5. TARTIŞMA

Aerobik, gram negatif basil olan *P. aeruginosa*, yalnızca yaygın görülen enfeksiyon etkeni olması nedeniyle değil aynı zamanda enfeksiyonlarının yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkili olması nedeniyle klinik önem arz etmektedir (Driscoll, 2007). Tüm dünyada nazokomial enfeksiyonların %10-15'inden sorumlu tutulmaktadır. Sahip olduğu doğal direnç mekanizmalarının yanı sıra birden fazla antimikrobiyal grubuna karşı kazanılmış direnç geliştirebilmesi *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisini zorlaştırmaktadır (Strateva, 2009).

Kazanılmış direnç mekanizmalarından biri olan MBL'lerin yayılımının hızlı olması, çeşitliliğinin her geçen gün artması ve türler arası yayılım gösterebilmesine karşın bu enzimlerin tanımlanmasında kullanılabilecek yöntemlerin standardizasyonu henüz sağlanamamıştır. Ayrıca MBL üretiminin klinik etkisi, hastane enfeksiyon kontrol ve antimikrobiyal tedavi politikaları üzerine etkisi net olarak belirlenememiştir (Cornaglia, 2007).

Acinetobacter baumannii'yi incelediğimizde ise; karbapenem direnci dahil olmak üzere çoklu antibiyotik direncinin giderek artan oranlarda karşımıza çıkması ve özellikle yoğun bakım birimlerinde salgınlara yol açabilmesi, bu etkenin öneminin artmasına ve sürekli gündemde olmasına neden olmaktadır (Schreckenberger, 2008). *Acinetobacter* türlerinin özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatmakta olan hastalarda ventilatör ilişkili pnömonilerde giderek artan sayılarda etken olarak gösterildiği rapor edilmektedir. Risk faktörleri, antibiyotik tedavisi, cerrahi girişim, yabancı cisim uygulamaları, mekanik ventilasyon, yoğun bakım ünitesinde kalma süresidir (Bergogne-Berezin, 2008).

A.baumannii yoğun bakım ünitelerinde pnömoni dışında dolaşım sistemi enfeksiyonu, menenjit, üriner sistem enfeksiyonu gibi nozokomial enfeksiyonlara neden olmaktadır (Schreckenberger, 2008). Ek olarak ayaktan devamlı peritoneal

diyaliz peritoniti, endokardit, menenjit, osteomyelit, artrit, korneal perforasyon da bildirilmiştir (Bergogne-Berezin, 2008).

Bu çalışmada *Acinetobacter baumannii* izolatları en çok yoğun bakım ünitelerinden (%53,7) izole edilmiştir. YBÜ'sini göğüs hastalıkları (%14,8) ve ortopedi ve travmatoloji (%9,1) servisi takip etmiştir. Keskin H. ve ark'nın(Keskin, 2014) yapıları çalışmada, 201 *Acinetobacter* izolatının en sık YBÜ (%53,7) ve acil servislerden (%14,4) izole etmişler, bunları beyin cerrahisi (%12,4) ve genel cerrahi klinikleri (%6,7) takip etmiştir.

Gözütok ve ark.(Gözütok, 2013) 2013'te yaptıkları çalışmada *A.baumannii* izolatlarını en sık yoğun bakım ünitesinden (%84,4) ve ikinci olarak ortopedi servisinden (%6,2) izole etmişlerdir. Türkiye'de yapılan geniş çaplı katılımla gerçekleştirilen bir çalışmada *Acinetobacter* izolatlarının en fazla (%90,3) yoğun bakım ünitesinde yatan hastalardan izole edildiğini bildirmişlerdir (Çiftçi, 2013). Bizim çalışmamızda da izolatların en sık YBÜ'den izole edilmesiyle diğer çalışmalarla uyumlu görülmüştür.

P.aeruginosa enfeksiyonları sıklıkla yoğun bakım servisleri olmak üzere, yanık üniteleri, kemoterapi ve radyoterapi üniteleri ve yoğun antibiyotik tedavisi uygulanan bölümlerde görülmektedir (Er, 2015).

Kırk farklı hastanenin dahil edilerek yapıldığı Belçika'daki bir çalışmada *P.aeruginosa* izolatlarının %38'i yoğun bakım ünitelerinden, %21'i dahili servislerden, %12'si cerrahi servislerden, %5.5'i hematoloji servisinden %23'ü ise diğer servislerde yatan hastalardan izole edildiği bildirilmiştir (Peix, 2009).

Tayvan'da yapılan bir çalışmada ise *P. aeruginosa* izolatlarının %37.8'i göğüs hastalıkları servisinden, %23.5'i cerrahi servislerden, %19.8'i ise poliklinik hastalarından izole edildiği rapor edilmiştir (Shu, 2012).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada 75 imipenem dirençli *P. aeruginosa*'nın en sık yoğun bakım ünitelerinden daha sonra sırasıyla cerrahi ve dahili birimlerden izole edildiğini bildirmişlerdir (Onguru, 2008). Bu çalışmada *P.aeruginosa* en sık yoğun bakım ünitelerinden (%35) izole edilmiştir. YBÜ'sini ortopedi ve travmatoloji (%17,5) ve göğüs hastalıkları (%12,5) servisi takip etmiştir.

Çok farklı klinik örneklerden *A.baumannii* suşları izole edilebilmektedir. Aral ve arkadaşları (Aral, 2010) Acinetobacter suşlarının %30'unu balgam, %29'unu yara sürüntüsü ve %25'ini kanda tespit etmişlerdir. Toplam 377 suşun dahil edildiği ülkemizdeki bir başka çalışmada ise trakeal aspirat (%43), kan (%19), yara sürüntüsü (%18), idrar (%6) ve balgamdan (%6) izole edildiği görülmüştür (Bayram, 2013). Gülhan ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada ise izolatların %54,9'u yara, %19,7'si kan, %5,6'sı solunum yolu örneklerinden meydana gelmektedir (Gülhan, 2009). Bizim çalışmamızda en sık kan (%22,3), balgam (%18,5), doku (%14,8) ve idrar (%11,2) örneklerinden izole edilmiştir.

Strateva ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada 203 *P. aeruginosa* suşunun %38,9'u idrar, %19,2'si cerrahi yara, %13,3'ü trekeal aspirat ve % 12,8'i balgam örneklerinden izole edilmiştir (Strateva, 2007).

Pitout J ve ark.'nın yaptığı bir çalışmada 241 *P. aeruginosa* suşunun %43'ü idrardan, %3'ü kandan, %21'i yaradan, %20'si solunum sistemi salgılarından ve kalan %9'u diğer klinik salgılardan izole edilmiştir (Pitout, 2005). Çalışmamıza dahil edilen 40 *P.aeruginosa* suşunun %27,5'i trakeal aspirat, %25'i balgam, %17,5'i idrar, %15'i yara örneği, %10'u kan kültürü, %5'i kateter örneklerinden izole edilmiştir.

Acinetobacter enfeksiyonlarının tedavisinde karbapenem, sulbaktam ve kolistin ilk tercih edilen antibiyotiklerdir. Fakat, yaygın olarak karbapenemlerin ampirik tedavide kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasına sebep

olmaktadır. Dirençli *Acinetobacter* enfeksiyonlarında aminoglikozidler başka bir antibiyotikle kombine şekilde kullanılabilir (Maragakis, 2008).

Çoğul antibiyotik dirençli suşların izole edilme oranlarındaki artış *A.baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir problem teşkil etmektedir. Bununla birlikte tedavide kullanılacak antibiyotik seçeneklerini de azaltmaktadır. Son zamanlarda çoğul dirençli kökenlerle ilişkili enfeksiyonlar da rapor edilmektedir. Antimikrobiyal direnç oranları merkezden merkeze farklılık gösterse de çoğul dirençli kökenlerin giderek artması endişe vericidir (Souli, 2008).

Ülkemizde 2004 -2005 yılları arasında altı merkezin katıldığı bir çalışmada *Acinetobacter* suşlarında imipenem direncinin % 33 ile % 62 arasında değiştiği bildirilmiştir (Gür, 2008). Atasoy ve arkadaşlarının (Atasoy, 2014) 2014 yılında yaptığı çalışmada incelenen suşlarda, *A.baumannii* tedavisinde sıklıkla tercih edilen karbapenemlere karşı çok yüksek oranda (> % 80) dirence sahip oldukları gözlenmiştir. Tigesikline (% 30.9) ve amikasine (% 58.6) karşı direnç saptanmıştır.

Beş yıllık antibiyotik direnç profillerinin ortaya konulduğu bir çalışmada *A.baumannii* 'ye karşı; piperasilin-tazobaktama % 96, sefepime % 95, siprofloksasine % 93, seftazidime % 94, gentamisine % 90, sefoperazon-sulbaktama % 89, meropeneme % 72, imipeneme % 71, trimetoprim-sülfametoksazole % 62, levofloksasine % 86, tetrasikline % 55, amikasine % 64 oranında direnç tespit edilmiştir (Bayram, 2013).

Shoja ve ark. 2017'de *A.baumannii* izolatları ile yaptıkları çalışmada siprofloksasine % 97,5, sefepim ve seftazidime % 92,5, amikasine % 80, gentamisine % 85 oranında direnç tespit etmişlerdir fakat kolistine direnç saptanmamıştır (Shoja, 2017).

Kaur ve ark.'nın 964 *A.baumannii* izolatu ile ilgili çalışmasında direnç oranları imipenem %40.3, amikasin %64.9, gentamisin %88.1, siprofloksasin %88, seftazidim %89.5, sefepim %86.9, piperasilin-tazobaktam %28.9 olarak bulmuşlardır (Kaur, 2014).

Bu çalışmada 54 *A.baumannii* izolatında imipenem direnci %81,5, meropenem direnci ise %77,7 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki antibiyotik direnç oranları tablo 4.5'te gösterilmiştir.

P.aeruginosa enfeksiyonlarında tedavisinde kullanılan antibiyotikler; piperasilin ve tikarsilin gibi penisilinler, seftazidim ve sefoperazon gibi üçüncü kuşak sefalosporinler, imipenem ve meropenem gibi karbapenemler ve siprofloksasin gibi kinolonlar ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Ancak gün geçtikçe artan direnç oranları nedeniyle bu antibiyotiklerin kullanılabilirliği tehdit altındadır (Zhao, 2010).

Adama HJ. ve ark.'nın 2011 yılında yapmış oldukları bir çalışmada kan kültürlerinden izole edilmiş 332 *P. aeruginosa* izolatının direnç oranları şu şekildedir; piperasilin/tazobaktam için %5.4, seftazidim için %9.2, gentamisin için %15.3, siprofloksasin için %19.0 olarak tespit edilmiştir (Adama, 2011).

Morfin-Otero R. ve ark.'nın 2012 yılında Meksika'da yapılan bir çalışmada iki farklı hastaneden 404 *P. aeruginosa* izole edilmiş ve bu izolatların %15.5'i piperasilin/tazobaktama, %24.0'ı seftazidime, %9.9'u sefepime, %31.9'u gentamisine, %23.7'si amikasin ve %20.0'ı siprofloksasine dirençli olarak tespit edilmiştir (Morfin-Otero, 2012).

Gupta V. ve ark.'nın Hindistan'da 2012 yılında yapılmış bir çalışmada ise 109 *P.aeruginosa* izolatının %90.8'inde piperasilin direnci, %63.3'ünde piperasilin/tazobaktam direnci, %65.1'inde amikasin direnci, %79.8'inde siprofloksasin direnci saptanmıştır (Gupta, 2012).

Bahar ve ark. (Bahar, 2010) ise 2010 yılında izole ettikleri *P.aeruginosa*'larda yapmış oldukları çalışmada imipenem dirençli izolatların %80'ini piperasiline, %100'ünü seftazidime, % 100'ünü gentamisine, %81.7'sini amikasine %77.4'ünü siprofloksasine dirençli olduğu belirtilmiştir.

Bayram ve ark. (Bayram, 2013) 2013 yılında yaptıkları çalışmada yanık hastalarından izole ettikleri 30 *P. aeruginosa* izolatının %31'ini pipersilin/tazobaktama, %32'sini seftazidime, %25'ini sefepime, %36'sını gentamisine, %21'ini amikasine, %25'ini siprofloksasine dirençli bulmuştur.

Bu çalışmada, çeşitli klinik örneklerden izole edilen *P.aeruginosa* izolatlarının imipenem direnci % 60, meropenem direnci ise %57,5 olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki *P.aeruginosa* antibiyotik direnç oranları tablo 4.6'da verilmiştir.

A.baumannii ve *P.aeruginosa* gibi non-fermentatif Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci enzim üretimi, eflüks pompalarının aşırı ekspresyonu, hedef bölge değişiklikleri, dış membran proteinleri veya porin kaybı gibi çeşitli mekanizmalarla gerçekleşir (McGowan, 2006).

Karbapenemlere karşı direnç sıklıkla pompa sistemleri ve membran geçirgenliğindeki azalmaya bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. MBL'lara bağlı direnç, karbapenemlerin yanı sıra birçok beta laktam antibiyotiğe karşı direnç gelişimine de sebep olmaları, klinikte kullanılacak inhibitörlerin bulunmayışı ve integronların üzerinde taşınarak bakteriler arasında hızla yayılabilmeleri nedeniyle giderek önemli bir hale gelmiştir. Ayrıca MBL genlerini taşıyan integronlar aminoglikozidler, kloramfenikol gibi farklı antibiyotik sınıfları, dezenfektanlar veya diğer beta-laktamaz genlerinin direnç faktörlerini taşıyan ek gen kasetlerini de barındırabilmektedir. Bu nedenle MBL üreten bakteriler, odak etken oldukları düşünülmese bile dikkate alınmalıdırlar. Çünkü aynı hastanın diğer vücut bölgelerine veya yakınındaki diğer hastalara bulaşma riski taşırlar (Cornaglia, 2007).

Dolayısıyla MBL üreten suşların erken tanımlanması uygun tedavi protokollerini belirlemek ve çoklu direncin yayılmasını önlemek için gereklidir. Gram negatif bakterilerde MBL varlığını araştıran çalışmalarda izolatların seçimiyle ilgili farklı kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Bazı araştırmacılar seftazidime (Arakawa, 2000), bazıları seftazidim ve/veya imipeneme (Picao, 2008), bazıları da (Aktaş, 2008; Al, 2011; Qu, 2009) bizim gibi karbapenemlere dirençli mikroorganizmaları çalışma kapsamına almışlardır.

Cornaglia ve ark. (Cornaglia, 2000) imipenem direncinin kriter olarak alındığı çalışmalarda MBL ürettiği halde karbapenemlere düşük düzeyde direnç gösteren suşların gözden kaçabileceğini belirtmişlerdir. Bu nedenle suş seçiminin iyi planlanması gerekmektedir.

Suşların belirlenmesini takiben MBL araştırılmasında kullanılacak yöntem seçimi gündeme gelmektedir. Bütün MBL'lar aktif bölgelerindeki çinkonun uzaklaştırılmasından etkilendikleri için çalışmalar bu özellik göz önünde bulundurularak yapılmıştır. Bununla birlikte MBL'lar arasındaki fark aktif bölgelerindeki küçük varyasyonlardan kaynaklanmakta bu nedenle tek bir inhibitör ajan tüm enzimlere etkin olamamaktadır. Dolayısıyla fenotipik testlerin sonuçları kullanılan yöntem, bakterinin cinsine, beta-laktam substrata ve MBL inhibitörüne bağlı olarak uyumsuzluk gösterebilmektedir (Walsh, 2005). MBL tespitinde günümüzde standardize edilmiş herhangi bir fenotipik yöntem yoktur. Dolayısıyla çalışmalar duyarlılığı ve özgüllüğü en yüksek testin belirlenmesine odaklanmıştır.

Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında, Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerin erken tanısı hem dirençli izolatların yayılmasını önlemek açısından, hem de klinisyenleri tedavi konusunda erken bilgilendirmek açısından çok önemlidir. Dirençli suşların oranlarının zamanla artış göstermesi laboratuvarlarda rutinde kolay uygulanabilen ve özgüllüğü yüksek, duyarlı yöntemlerin bulunmasını zorunlu kılmıştır. Geliştirilen fenotipik yöntemlerden MBL E test, çift disk sinerji testi, kombine disk testi ve modifiye Hodge testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilgili

çalışmaların yapılmasına günümüzde devam edilmektedir. Günümüzde halen duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test yönteminin olmaması araştırmacıları daha fazla çalışma yapmaya yöneltmiştir. Çalışmaların çoğunda bir veya iki fenotipik yöntem uygulanmış, PCR analizi ile sonuçlar doğrulanmıştır (Bahar, 2004; Urban, 2003). Bizim çalışmamızda ise iki farklı fenotipik yöntemle MBL enzimi varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler kombine disk testi ve modifiye Hodge testidir.

Yan ve ark. (Yan, 2004)'nın 2004 yılında yayınladıkları çalışmada KDDT testinin *P. aeruginosa* izolatlarında metallo-beta-laktamazın fenotipik tanısındaki duyarlılığının % 87, özgüllüğünün ise % 96.7 olduğu tespit etmişlerdir. Lee ve ark. (Oh, 2003) disk difüzyon yöntemiyle imipenem dirençli *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarına KDDT testi uygulamış ve sonuçları PCR analizi ile doğrulamışlardır. Çalışma sonunda KDDT testinin bazı metallo-beta-laktamazları yüksek duyarlılıkta saptarken bazı türleri saptamada başarısız olduğunu bildirmişlerdir.

Erdil ve ark. (Erdil, 2014) yaptıkları çalışmada *A.baumannii* izolatlarında MBL pozitifliği en çok %98,9 oranı ile kombine disk testi ve çift disk sinerji testi ile saptarken, modifiye hodge testinde %95,7 pozitiflik saptanmıştır. Ulusoy AL ve ark. (Ulusoy, 2011) MBL'ın fenotipik tespiti amacıyla 79 *Acinetobacter baumannii* izolatının KDDT ile 46'sında (%58,2) MBL üretildiği, çift disk sinerji testi ile 44'ünde (%55,7), MHT ile 55'inde (%69,6) MBL pozitifliği saptandığı belirtilmiştir.

Sesli-Çetin ve ark'nın (Sesli-Çetin, 2009) 2009 yılında yaptığı çalışmada MBL üretimi imipenem dirençli *A.baumannii* çift disk sinerji testi ile %84, KDDT ile %75, MHT ile %74 oranında bulunmuştur.

Bu çalışmaya 54 tane *A.baumannii* ve 40 tane *P. aeruginosa* izolatu dahil edilmiştir. Bu izolatlar aynı zamanda karbapenem grubunda yer alan antibiyotiklerden (meropenem, imipenem) en az bir tanesine dirençli bulunmuştur.

MBL enzim saptanmasında kullanılan testlerin temelinde enzimin metal şelatör tarafından inhibisyonu mantığı yatmaktadır. Bizim çalışmamızda yer alan Kombine disk yöntemi de bu prensibe dayanan testlerden bir tanesidir.

Metallo-beta-laktamaz enzimlerinin araştırılmasında kullanılan çift disk sinerji testine(ÇDST) göre daha objektif olan KDDT, sıklıkla kullanılan fenotipik bir yöntemdir. ÇDST'nde gerçek sinerjizmin tespit edilmesinde yorumlayan kişinin deneyimi çok önemlidir. KDDT ile yapılan çalışmalarda da kullanılan çeşitli inhibitörlerin, eşik değer olarak kabul edilen zon çapı farklarının sonuçları etkilediği çeşitli çalışmalarda ortaya konulmuştur.

Qu ve ark.'nın 2009 yılında yaptıkları çalışmada (Qu, 2009) ÇDST, KDDT, E-test ve PCR ile *P. aeruginosa* izolatlarında Metallo-beta-laktamaz varlığını araştırmışlar; en iyi sonuçları IMP-EDTA (750 µg)'nin kullanıldığı ve 6 mm'lik zon çapı farkının eşik değer kabul edildiği KDDT ile elde etmişlerdir. Testin duyarlılığını, özgüllüğünü, pozitif ve negatif prediktif değerlerini %100 olarak tespit etmişlerdir. Sadece *P. aeruginosa* izolatlarında yapılmış olmakla birlikte KDDT'nin ÇDST ve hatta E-testten daha üstün olduğunu belirtmişlerdir.

Picao ve ark.'nın 2008 yılında yaptıkları çalışmada (Picao, 2008) farklı MBL genlerine sahip izolatlarda 8 mm'lik zon çapı farkını eşik değer kabul ettikleri ve inhibitör bileşik olarak CAZ-EDTA / CAZ-MPA kullandıkları KDDT ile *Pseudomonas* türleri için testin duyarlılığını %96, özgüllüğünü %100 bulmuşlar; *Acinetobacter* türleri için testin performansının başarılı olmadığını belirtmişlerdir.

Yong ve ark. (Yong, 2002), 750 ve 1000 mg EDTA içeren farklı iki kombine disk hazırlayarak çoğunluğu VIM-2 üreten MBL pozitif *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında imipenem-EDTA disk metodunu test etmişlerdir. 750 mg EDTA içeren diskin kullanıldığı yöntem tüm MBL üreten *Pseudomonas*'ları ayırt edebilmiş ve *Acinetobacter spp.* için duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla % 95.7 ve % 91 olarak tespit etmişlerdir. *Pseudomonas aeruginosa*'da tüm MBL pozitif izolatlar,

EDTA eklendiğinde ≥ 7 mm inhibisyon zonunda artış göstererek MBL negatif izolatlardan etkili bir şekilde ayrılmıştır. Tek başına kombine diskin inhibisyon zonlarının büyüklüğünün de yararlı olduğu gösterilmiş, MBL pozitif izolatlarda imipenem-EDTA disklerinin inhibisyon zonları ≥ 17 mm iken MBL negatif izolatlarda ≤ 14 mm olarak gösterilmiştir. Yong ve ark.'larının yaptığı bu çalışmada imipenem-EDTA disk metodunun basit ve oldukça duyarlı olduğu, özgüllüğünün *Pseudomonas spp.* için mükemmel, *Acinetobacter spp.* için iyi olduğu görülmektedir.

Pitout ve ark. (Pitout, 2005), MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarını tespit etmek için bir EDTA disk tarama testi geliştirmişlerdir. İmipenem ve meropenem disklerinin tek başına ve 930 μg EDTA ile kombinasyonunda, inhibisyon zon çapları belirlenmiş ve bu testin MBL E-test ile kıyaslanabilir olduğu görülmüştür. PCR ile blaVIM ve blaIMP genlerine sahip izolatlarda meropenem-EDTA disk tarama testi % 100 duyarlılık, % 97 özgüllük gösterirken imipenem-EDTA disk testi % 96 duyarlılık, % 91 özgüllük göstermiştir. 930 μg EDTA varlığında ≥ 7 mm zon çapında artış MBL varlığı için pozitif test olarak kabul edilmiştir.

Altoparlak ve ark. (Altoparlak, 2005) karbapenemlere dirençli 40 tane *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* suşunun imipenem-EDTA KDDT ile 22 (% 55)'ini pozitif olarak bulmuşlardır.

Ülkemizdeki çalışmalarda KDDT için yalancı pozitiflik oranlarının yüksek olduğu gözlenmektedir. Aktaş ve ark. (Aktaş, 2008) blaIMP ve blaVIM negatif *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatlarında IMP- EDTA (0.5 M 10 μL)'nin kullanıldığı KDDT ile yalancı pozitifliği %100 bulmuşlar, IMP- EDTA(0.1 M 10 μL) ile yalancı pozitiflik oranının %0-%11 oranında azaldığını tespit etmişlerdir.

Dağı ve ark. (Dağı, 2012) IMP- EDTA(0.5 M 10 μL)'nin kullanıldığı KDDT ile karbapenem dirençli 202 *A.baumannii* suşunun 139'unda (% 69) MBL pozitifliği bulmuşlar ancak izolatların hiçbirinde PCR ile blaIMP ve blaVIM genlerini gösterememişlerdir. Yalancı pozitifliğin EDTA'nın bakterisidal etkisinden

kaynaklanabileceğini veya karbapenem direncinden IMP ve VIM dışı enzimlerin sorumlu olabileceğini açıklamışlardır.

Al M. ve ark. (Al, 2011) PCR ile sadece blaIMP-1 geninin araştırıldığı bir çalışmada da IMP- EDTA(0.5 M 10 µL)'nın kullanıldığı KDDT ile 79 Acinetobacter izolatının % 58,2'sinde MBL varlığı tespit edilmiş ancak izolatların hiçbirinde PCR pozitifliği bulamamışlardır.

EDTA'nın bakteri hücre duvarı geçirgenliğini artırarak bakterisidal özellik kazanması, EDTA ile şelasyon oluşturan çinkonun imipenemin etkinliğini ve *P. aeruginosa*'nın OprD ekspresyonunu azaltması yalancı pozitifliğin nedeni olarak gösterilmektedir (Conejo, 2003).

Bu çalışmada bir yıllık süre içerisinde toplanan *P. aeruginosa* ve *A.baumannii* suşları dahil edilmiştir. İmipenem ve meropenem diskleri zon çapları, EDTA'lı disklerin zon çaplarından 7 mm'den daha az ise sonuç pozitif olarak kabul edildi. Çalışmamızda 40 *P.aeruginosa* suşunun 21 (%52.5)'i imipenem-EDTA disk testi ile 23 (% 57.5)'ü meropenem-EDTA disk testi ile pozitif olarak tespit edilmiştir. 54 *A.baumannii* suşunun ise 35 (% 68.6)'i imipenem-EDTA disk testi ile 46 (% 90.2)'sı meropenem-EDTA disk testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Fenotipik testler içinde en yüksek pozitiflik oranı *A.baumannii*'de imipenem-EDTA disk testi (% 90.2) ve *P.aeruginosa*'da meropenem-EDTA disk testi 23 (% 57.5) yönteminde görülmüştür. En az pozitiflik oranı *A.baumannii* için imipenem-EDTA disk testi (% 68.6) iken *P.aeruginosa* için MHT (%12.5) olmuştur. Testlerin pozitiflik oranları tablo 4.7'de gösterilmiştir.

MHT ise MBL tespitinde diğer fenotipik yöntemlerden farklı olarak enzim inhibisyonu temeline dayanmamaktadır. MBL enzimi üreten bakteri varlığında aslında imipeneme duyarlı olan bir bakteriye imipenemin etkisiz hale gelmesi sonucu diskin etrafında üremenin görülmesi ile test pozitif olarak kabul edilir. OXA ve MBL gibi enzimlerin varlığını birlikte tespit edebilmesi ve uygulaması kolay bir test

olması nedeniyle kullanışlı bir yöntemdir. Bu enzimlerin ayırımını ortaya koyamaması nedeniyle epidemiyolojik olarak kullanışlı bir test olarak görülmemekle birlikte AmpC üreten suşlarla azalmış ya da kaybolmuş porin salınımı yalancı pozitif sonuçlara neden olabilmektedir (Patel, 2009; Cohen Stuart, 2010). Bizim çalışmamızda modifiye Hodge testi *A.baumannii* suşlarında diğer testlerle benzerlik gösterirken, *P. aeruginosa* suşlarında pozitiflik oranının düşük olması yorum farkı kaynaklanmaktadır.

MHT MBL tespitinde ÇDST, KDDT gibi EDTA ile inhibisyon temeline dayanmamaktadır. Oh ve ark.(Oh, 2003) yaptıkları çalışmada MHT'nin MBL üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alınabildiğini belirtmektedir.

Lee ve ark.(Lee, 2010) imipeneme dirençli *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter* izolatlarında modifiye Hodge testinin duyarlılığını %100, özgüllüğünü ise %88 olarak saptamışlardır. MHT'nin MBL üreten izolatların hepsini tanımlayamadığını, yanlış negatif sonuçlar alınabildiğini belirtmişlerdir.

Amudhan ve ark. (Amudhan, 2012) 2012'de yaptıkları çalışmada MBL pozitifliğini fenotipik testlerden MHT ile %94,4, KDDT ile %80,4 olarak buldukları *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* kökenlerinde genotipik yöntemle %51,4 oranında VIM ve IMP genlerini pozitif olarak bulmuşlardır.

Ulusoy ve ark. (Ulusoy, 2011) yaptığı bir çalışmada ise çalışmaya alınan 79 *Acinetobacter* izolatının MHT ile 55'i (%69.6) MBL pozitif, 24'ü (%30.4) ise negatif olarak tespit edilmiştir.

Noyal ve ark. (Noyal, 2009) 2009 yılında yaptığı bir çalışmada meropeneme dirençli 32 *P. aeruginosa* izolatının 9 (% 28.1)'unda MHT ile MBL üretimi tesbit edilirken 46 *A.baumannii* izolatının sadece 2 (% 2.2)'sinde MBL üretimi tesbit edilmiştir.

Ülkemizde yapılan bir başka çalışmada yaptığı çalışmada modifiye Hodge testi ile meropeneme dirençli 40 *Acinetobacter baumannii* izolatının 29 (% 72.5)'unda, 10 *P. aeruginosa* izolatının 6 (%60)'sında MBL pozitifliği saptanmıştır (Çağlar, 2012).

Bu çalışmada 40 *P.aeruginosa* suşunun 5 (%12.5)'i MHT ile pozitif olarak tespit edilmiştir. 54 *A.baumannii* suşunun 43 (% 84.3)'ü MHT ile pozitiflik olarak tespit edilmiştir. Çalışmamızda *A.baumannii*'ye oranla *P.aeruginosa*'da MHT pozitifliği düşük bulunmuştur, ancak KDDT ve MHT ile elde edilen MBL oranları ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmaya 2017 ile 2018 tarihleri arasında Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik örneklerden izole edilen tekrarı olmayan *A.baumannii* ve *P.aeruginosa* izolatları dahil edilmiştir.

2. Çalışmada *Acinetobacter baumannii* izolatları en çok yoğun bakım ünitelerinden (%53,7) izole edilmiştir. YBÜ'sini göğüs hastalıkları (%14,8) ve ortopedi ve travmatoloji (%9,1) servisi takip etmiştir. *P.aeruginosa* ise en sık yoğun bakım ünitelerinden (%35) izole edilmiştir. YBÜ'sini ortopedi ve travmatoloji (%17,5) ve göğüs hastalıkları (%12,5) servisi takip etmiştir.

3. *A.baumannii* etkeni en sık kan (%22,3), balgam (%18,5), doku (%14,8) ve idrar (%11,2) örneklerinden izole edilmiştir. Bu çalışmaya dahil edilen 40 *P.aeruginosa* suşunun %27,5'i trakeal aspirat, %25'i balgam, %17,5'i idrar, %15'i yara örneği, %10'u kan kültürü, %5'i kateter örneklerinden izole edilmiştir.

4. *A.baumannii* izolatlarında imipenem direnci %81,5, meropenem direnci ise %77,7 olarak tespit edilmiştir. *A.baumannii* izolatlarının hepsi kolistine duyarlıdır. Çalışmamızda, çeşitli klinik örneklerden izole edilen. *P.aeruginosa* izolatlarının imipenem direnci % 60, meropenem direnci ise %57,5 olarak tespit edilmiştir.

5. Hastanemizde *A.baumannii* ve *P. aeruginosa* suşlarında yüksek oranda karbapenem direnci ve MBL üretimi saptanmıştır. Bu suşların tamamında etkili olan tek antimikrobiyal ajanın kolistin olduğu tespit edilmiştir.

6. MBL tayini için yapılan tüm çalışmalar değerlendirildiğinde fenotipik testlerin uygulanması sırasında diskler arası mesafenin doğru ayarlanması, test sonucunun yorumlanması gibi küçük detayların sonuçları etkilediği görülmektedir.

7. Bir yıllık süre içerisinde toplanan ve belirtilen koşullara uygun olan 40 *P. aeruginosa* ve 54 *A.baumannii* suşu dahil edilmiştir. Çalışmamızda 40 *P.aeruginosa* suşunun 5 (%12.5)'i MHT ile, 21 (%52.5)'i imipenem-EDTA disk testi ile 23 (% 57.5)'ü meropenem-EDTA disk testi ile pozitif olarak tespit edilmiştir. 54 *A.baumannii* suşunun 43 (% 84.3)'ü MHT ile, 35 (% 68.6)'i imipenem-EDTA disk testi ile 46 (% 90.2)'sı meropenem-EDTA disk testi ile pozitif olarak bulunmuştur. Fenotipik testler içinde en yüksek pozitiflik oranı *A.baumannii*'de imipenem-EDTA disk testi (% 90.2) ve *P.aeruginosa*'da meropenem-EDTA disk testi 23 (% 57.5) yönteminde görülmüştür. En az pozitiflik oranı *A.baumannii* için imipenem-EDTA disk testi (% 68.6) iken *P.aeruginosa* için MHT (%12.5) olmuştur.

ÖZET

***P.aeruginosa* ve *A.baumannii* İzolatlarında İmipenem-EDTA/Meropenem-EDTA Disk Yöntemi ve Modifiye Hodge Testi ile Metallo-Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması**

Metallo beta-laktamaz (MBL)'lar aztreonam dışında karbapenemler de dahil olmak üzere tüm betalaktam grubu antibiyotikleri hidrolize ederler. Antibiyotiklerdeki direncin yayılmasını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin tespit edilmesi gerekmektedir. Bu çalışmanın amacı, giderek artan imipenem ve meropenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* klinik izolatlarında MBL üretimini iki farklı fenotipik yöntem kullanarak incelenmesidir. Karbapenem dirençli 54 *A.baumannii* ve 40 *P.aeruginosa* klinik suşlarına MBL tespiti için Kombine disk difüzyon testi(KDDT) ve Modifiye Hodge testi(MHT) uygulanmıştır. KDDT: 0.5 McFarland bakteri süspansiyonu müller hinton agara ekildi. İki imipenem diski (10µg) aralarında en az 22 mm olacak şekilde besiyeri yüzeyine yerleştirildi, imipenem disklerinden bir tanesinin üzerine 10 µl EDTA eklendi. Aynı yöntem meropenem/EDTA için de uygulandı. İmipenem ve meropenem diskleri zon çapları, EDTA'lı disklerin zon çaplarından 7 mm'den daha az ise pozitif kabul edildi. MHT: Müller Hinton Agar besiyerine *E.coli* ATCC 25922 standart suşu yayıldı, meropenem 10 µg diski plağın ortasına yerleştirildi. İzolatlar imipenem diskinden periferine doğru ekildi. Duyarlılık zon çapının yonca yaprağı şeklinde bozulması durumunda test pozitif kabul edildi. Bu çalışmada, 40 *P.aeruginosa* suşunun 5 (%12.5)'i MHT ile, 21 (%52.5)'i imipenem/EDTA disk testi ile 23 (% 57.5)'ü meropenem/EDTA disk testi ile pozitiflik verdi. 54 *A.baumannii* suşunun 43 (% 84.3)'ü MHT ile, 35 (% 68.6)'i imipenem/EDTA disk testi ile 46 (% 90.2)'sı meropenem/EDTA disk testi ile pozitiflik olarak tespit edildi. Çalışmamızdaki KDDT ve MHT ile elde edilen MBL oranları ülkemizde ve yurt dışında yapılan çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur. Sonuç olarak, antibiyotiklere karşı hızla gelişen direnç probleminin önüne geçebilmek için yöresel olarak antibiyotik duyarlılık profilleri belirlenmeli ve direnç yayılımını önlemek için MBL varlığı birden farklı yöntemle taranmalıdır. *A.baumannii* ve *P.aeruginosa*'nın etken

olduğu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotik duyarlılık test sonuçlarına göre antibiyotik reçete edilmelidir.

Anahtar Kelimeler: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Metallo beta-laktamaz



SUMMARY

Investigation of Metallo-Beta-Lactamase Producing *P.aeruginosa* and *A.baumannii* Isolates by Imipenem-EDTA/Meropenem-EDTA Disk Method and Modified Hodge Test

Metallo-beta-lactamase (MBL) hydrolyzes all betalactam group antibiotics, including carbapenems, except for aztreonam. In order to prevent the spread of antibiotic resistance and to guide the treatment, carbapenem resistance types should be determined. The aim of this study is to investigate MBL production by using two different phenotypic methods in increasing imipenem and meropenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. Combined disk diffusion (CDT) test and Modified Hodge test (MHT) were performed to detect MBL of 51 *A.baumannii* and 40 *P.aeruginosa* clinical strains with resistant to carbapenem. The CDT:0.5 McFarland bacteria suspension was plated into the Muller Hinton Agar. The two imipenem disks (10µg) were placed on the medium surface with a minimum of 22 mm between them, 10 µl of EDTA was added onto one of the imipenem disks. The same method was applied for meropenem/EDTA. The results were considered to be positive if zone diameters of imipenem and meropenem disks were less than 7 mm from the zone diameters of EDTA disks. MHT: *E.coli* ATCC 25922 standard strain was spread on Müller Hinton Agar medium, 10 µg of meropenem was placed in the center of the plate. Isolates were plated from the imipenem disk to the periphery. The deterioration of sensitivity zone clover leaf accepted as positive. In this study, 5 (12.5%) of 40 strains of *P.aeruginosa* were positive by MHT, and 21 (52.5%) were positive by imipenem/EDTA disk test and 23 (57.5%) by meropenem/EDTA disk test. 43 (84.3%) of 54 *A.baumannii* strains were detected by MHT, 35 (68.6%) were by imipenem/EDTA disk test and 46 (90.2%) were positive by meropenem/EDTA disk test. In our study, we found that MBL rates obtained with CDT and MHT were consistent with the studies performed in our country and abroad. In conclusion, antibiotic susceptibility profiles should be determined in order to prevent the rapidly growing resistance problem against antibiotics and MBL should be screened by different methods to prevent resistance

spread. Antibiotics should be prescribed in according to antibiotic susceptibility test results for the treatment of *A.baumannii* and *P.aeruginosa* infections.

Key Words: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, Metallo beta-lactamase



KAYNAKLAR

- ADAMA HJ, DECORBYB M, RENNİEC R, KARLOWSKYA JA, HOBANA DJ, ZHANELB GG (2011). The Canadian Antimicrobial Resistance Alliance (CARA): Prevalence of antimicrobial resistant pathogens from blood cultures from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2007–2009 study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 69: 307–313,.
- AKTAŞ Z, BAL KAYACAN Ç. (2008). Investigation of metallo-beta-lactamase producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* by E-test, disk synergy and PCR. *Scand J Infect Dis*;40:320-5.
- AL M, MUMCUOĞLU İ, AKSU N ve ark. (2011) İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*;41(1):2936.
- ALTOPARLAK U, AKTAS F, CELEBİ D, OZKURT Z, AKCAY MN. (2005) Prevalence of metallobetalactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*; 31: 707–710.
- AMUDHAN MS, SEKAR U, KAMALANATHAN A, BALARAMAN S. (2012) bla(IMP) and bla(VIM) mediated carbapenem resistance in *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species in India. *J Infect Dev Ctries*, 6:757-62.
- ARAKAWA Y, SHİBATA N, SHİBAYAMA K et al. (2000) Convenient test for screening β -lactamase producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*; 38: 40-43.
- ARAKAWA Y., MURAKAMİ M., SUZUKİ K., ITO H., W ACHAROTAYANKUN R., OHSUKA S., KATO N., AND OHTU M. (1995) A novel integron -like element carrying the metallo-(3-lactamase gene blaIMP- *Antimicrob. Agents Chemother*;39:1612-1615.
- ARAL M, DOĞAN S, PAKÖZ NİE. (2010) Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarının antibiyotiklere direnç oranlarının araştırılması. *Ankem Derg.*; 24(4): 215-9.
- ATASOY A.R., KARAKEÇE E., TERZİ H.A., ÇİFTÇİ İ.H. (2014) Klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter baumannii* suşlarında antimikrobiyal direnç. *Cer San D (J Surg Arts)*;;7(1):7-10.
- AYAN M, DURMAZ R, AKTAS E, DURMAZ B. (2003). Bacteriological, Clinical and Epidemiological Characteristics Of Hospital Acquired *Acinetobacter baumannii* Infection in a Teaching Hospital. *J Hosp Infect*, 54(1):39–45.
- BAHAR G, MAZZARİOL A, KONCAN R, MERT A, FONTANA RG, ROSSOLİNİ M, CORNAGLIA G. (2004) Detection of VIM–5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother*; 54: 282–283.
- BAHAR İH, ESEN N. (2008). *Acinetobacter* Türleri ve Diğer Gram Negatif Nonfermentatif Basiller. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2195-2201.

- BAHAR MA, JAMALI S, SAMADIKUCHAKSARAEI A: (2010) .Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains carry metallo- β -lactamase gene blaVIM in a level I Iranian burn hospital. *Burns*, 36: 826–830,
- BARON EJ, FINEGOLD SM. (1990) *Diagnostic Microbiology*. St. Louis: The C. V. Mosby Company; pp.148-386.
- BAYRAM Y, GÜLTEPE B, BEKTAŞ A, PARLAK, GÜDÜCÜOĞLU H. (2013) Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antibiyotiklere Direnç Oranlarının Araştırılması. *Klinik Dergisi*; 26(2): 49-53
- BELLAÏS S., MIMOZ O., LEOTARD S., JACOLOT A., PETITJEAN O., AND NORDMANN P. (2002) Efficacy of β -lactams for treating experimentally induced pneumonia due to a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase-producing strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* ,46:2032-2034.
- BERGMAN U, SCHEFFER J, KOLLER M, SCHONFELD W, ERBS G, MÜLLER FE, KÖNIG W. (1989) Induction of inflammatory mediators (histamin and leukotrienes) from rat peritoneal mast cells and human granulocytes by *Pseudomonas aeruginosa* strains from burn patients. *Infect Immun*; 57: 2187-2195.
- BERGOGNE-BEREZIN E, TOWNER KJ. (1996.) *Acinetobacter* spp As Nosocomial Pathogens. Microbiological Clinical and Epidemiological Features. *Clin Microbiol Rev*, 9, 148- 65.
- BERGOGNE-BEREZIN E. (2008). Importance Of *Acinetobacter* Spp. Ed: Bergogne-Berezin E. *Acinetobacter Biology And Pathogenesis*, 1-85, Springer, Paris, France
- BİLGEHAN H. (1990.) *Klinik Mikrobiyoloji*. İzmir: Barış Yayınevi; 1995. pp.161-172. 2. Baron EJ, Finegold SM. *Diagnostic Microbiology*. St. Louis: The C. V. Mosby Company; pp.148-386.
- BROOKS GF, BUTEL JS, MORSE SA. (1998) *Medical Microbiology*. Stamford: Twenty-First Edition; pp.231-236.
- BUSH K. (1989) Classification of β -lactamases: Groups i, 2a, 2b and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*;33:264-70.
- BUSH K., JACOBY GA., MEDEIROS AA.(1995) A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1211-33.
- BUSH KL. (1999) ; β -Lactamases of increasing clinical importance. *CurrPharm Des* 5:839-845.
- CAN F, AZAP Ö. (2006.) Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Biyofilm Oluşumu. *İnfeksiyon Dergisi*, 20(3), 159-163.
- CARMELI Y., TROILLET N., ELİOPOULOS GM et al. (1999) Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*;43:1379-82.
- CHU YW., AFZAL-SHAH M., HOUANG ET., PALEPOU MI., LYON DJ., WOODFORD N, AND LIVERMORE DM. (2001) IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial

- Acinetobacter spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. Antimicrob Agents Chemother ;45: 710-714.
- COHEN STUART J, LEVERSTEIN-VAN HALL MA. (2010) Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. Int J Antimicrob Agents; 36: 205-10.
- COLIN D, LOUIS D, BERNILLON J, GUINAND M, WALLACHE J, LAS A. (1997) Alkaline protease and elastase in clinical strains of Pseudomonas aeruginosa: quantification by immunochemical methods. FEMS Immun Med Microbiol; 18: 175-184.
- CONCHA NO., JANSON CA., ROWLING P., PEARSON S., CHEEVER CA., CLARKE BP., LEWIS C, GAILENI M., FRERE JM., PAYNE DJ, BATESON JH., AND ABDEL-MEGUID SS. (2000) Crystal structure of the IMP-1 metallo P-lactamase from Pseudomonas aeruginosa and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. Biochemistry;39:4288-4298.
- CONEJO MC, GARCIA I, MARTINEZ L, PICABEA L, PASCUAL A. (2003) Zinc eluted from siliconized latex urinary catheters decreases OprD expression, causing carbapenem resistance in Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother;47:2313-5.
- CORNAGLIA G, AKOVA M, AMICOSANTE G, CANTON R, CAUDA R, DOCQUIER J-D et.al. (2007) Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. International Journal of Antimicrobial Agents, , 29: 380-388.
- CORNAGLIA G, MAZZARIOL A, LAURETTI L, ROSSOLINI, G, FONTANA R. (2000) Hospital outbreak of carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa producing VIM-1, a novel transferable metallo-beta-lactamase. Clin Infect Dis;31:1119-25
- CORNAGLIA G., MAZZARIOL A., FONTANA R. (2000) The astonishing complexity of antibiotic resistance. Clin Microbiol Infect;6(suppl 3):93-4.
- CORNAGLIA G., RICCIO ML., MAZZARIOL A., LAURETTI L, FONTANA R, AND ROSSOLINI GM. (1999) Appearance of IMP-1 metallo-P-lactamase in Europe. Lancet;353:899-900.
- ÇAĞLAR H. (2012) Gram negatif non fermentatif bakterilerde metallo-beta-laktamaz enziminin farklı yöntemlerle gösterilmesi ve bu yöntemlerin karşılaştırılması.. Uzmanlık terzi.
- ÇİFTÇİ İH, AŞIK G, KARAKEÇE E. (2013) Distribution Of Bla_{oxa} Genes İn Acinetobacter baumannii Strains: A Multicenter Study. Mikrobiyol Bul, , 47(4): 592-602.
- ÇİFTÇİ İH, AŞIK G. (2011.) Acinetobacter baumannii'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. Ankem, 25(3):196-207
- DAĞI H, KUŞ H, KEYİK Ş, ARSLAN U, TUNCER İ, FINDIK D. (2012) Karbapenemlere dirençli Acinetobacter baumannii suşlarında metallobeta-laktamaz varlığının araştırılması. ANKEM Derg;26(4):187-92.
- DELLEN CU, IGLEWSKI BH. (1998) Cell to cell signaling and Pseudomonas aeruginosa infections. Emerg Infect Dis; 4: 551-560.

- DENTON M, WILCOX MH. (1997) Antimicrobial treatment of pulmonary colonization and infection by *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis patients. *J Antimicrob Chemother*; 40: 468-474.
- DOCQUIER JD., RICCIO ML., MUGNAIOLI C, LUZZARO F., ENDIMIANI A., TONIOLO A, AMICOSANTE G., AND ROSSOLINI GM (2003.) IMP-12, a new plasmidencoded metallo-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.*;47:1522-1528.
- DOIG P, PARANCHYCH W, SASTRY PA, IRVIN RT. (1989) Human buccal epithelial cell receptors of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of glycoproteins with pilus binding activity. *Can J Microbiol*; 35: 1141-1145.
- DRISCOLL JA, BRODY SL, KOLLEF MH: (2007) The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs*, , 67:351-68.
- DUMAN Y., KUZUCU Ç., TEKEREKOGLU M.S. (2017) 2011 ve 2015 yıllarında izole edilen çoğul ilaç dirençli acinetobacter baumannii suşlarının, tigesiklin minimum inhibitör konsantrasyon değerlerinin karşılaştırılması. *Med Science*;6(1):26-9
- ER H., ALTINDIŞ M, AŞIK G, DEMİR C. (2015) Seftazidime Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Beta-Laktamazların Moleküler Epidemiyolojisi. *Mikrobiyol Bul.* 49(2), 156-165.
- ERDEM B. (1999) *Pseudomonaslar*. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş Kitabevi;. pp.551-571.
- ERDİL Z, M. UYANIK H, YAZGI H, AYYILDIZ A. (2014.) Nonfermentatif Gram Negatif Basillerde Metallo beta laktamaz Varlığının Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 44(1):10-17
- FOURNIER PE, RICHET H. (2006.) The Epidemiology And Control Of *Acinetobacter baumannii* In Health Care Facilities. *Clin Infect Dis*, 42(5), 692-9.
- FRITSHE TR, SADER HS, TOLEMAN MA, WALSH TR, JONES RN. (2005) Emerging metallo-beta-lactamase- mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis*;41:S276-8.
- GALES AC, MENEZES LC, SILBERT S., AND SADER HS. (2003) Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-(3-lactamase. *J Antimicrob Chemother.*;52:699-702.
- GIBB, AP., TRIBUDDHARAT C, MOORE RA., LOUIETJ, KRULICKI W, LIVERMORE DM, PALEPOU FM., AND WOODFORD N (2002.) Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new bla_{IMP} allele, bla_{IMP}-7. *Antimicrob Agents Chemother.*;46:255-258.
- GISKE CG., RYLANDER M., AND KRONVALL G. (2003) VIM-4 in a carbapenemresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* isolated in Sweden. *Antimicrob Agents Chemother*;48:3034-3035.

- GÖZÜTOK F, SARIGÜZEL FM, ÇELİK İ, BERK E, AYDIN B, GÜZEL D. (2013) Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Acinetobacter baumannii* Suşlarının Antimikrobiyal Direnç Oranlarının Araştırılması. *Ankem Derg.*, 27 (1): 7-12.
- GUPTA V, SİDHU S, CHANDER J: (2012) Metallo- β -lactamase producing nonfermentative gram-negative bacteria: An increasing clinical threat among hospitalized patients. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 718-721,.
- GÜLAY Z, TAŞKIRAN Aİ, KAPLAN O, SAYLAK MÖ. (2001) Beta-laktamazlar. *DEU Tıp Fak Derg*; 12: 343-358.
- GÜLAY Z. (2003) Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. İçinde Yüce A., Çakır N. *İnfeksiyon Hastalıkları*. İzmir: İzmir Güven Kitabevi; pp.87-93.
- GÜLHAN B, NERGİZ Ş, MEŞE S, ÖZEKİNCİ T , ATMACA S. (2009). *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Tigesiklin İçin Disk Difüzyon Yöntemiyle Elde Edilen Zon Çaplarının İki Farklı Kriterlere Göre Değerlendirilmesi. *Ankem Derg*, 23(2):78-81
- GÜR D, GÜLAY Z, AKAN OA, et al. (2008) Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyol Bult*; 42: 537-44.
- GÜR D. (2005) Beta-laktamazlar. İçinde Ulusoy S.(ed.). *Beta Laktamazlar ve Klinik Önemi* Ankara:Bilimsel tıp yaymevi; pp.35-42.
- GÜR D. (2004) Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları, İçinde Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. *Önemli ve Sorunlu Gram Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları*, Ankara; 69-83
- HANSON ND., HOSSAİN A., BUCK LL., MOLAND ES., AND THOMSON KS (2004.) . A program and abstract of the 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, D.C., abstr. C1-291,
- HARTZEL DJ, KİM SA, KORTEPETER MG, MORAN KA. (2007). *Acinetobacter Pneumonia: A Review*. *Med Gen Med*,9(3):4-11.
- JAWAD A, HAWKEY PM, HERİTAGE, J, SNELLİNG AM. (1994.) Description Of Leeds *Acinetobacter* Medium A New Selective And Differential Medium For İsolation Of Clinically
- KAUR A, GUPTA CV, CHHİNA D. (2014) Prevalence of metallo-beta-lactamase-producing(MBL) *Acinetobacter* species in a tertiary care hospital. *Iranian Journal of Microbiology*,; 6:22-25.
- KESKİN H, TEKELİ A, DOLAPÇI İ, ÖCAL D. (2014) Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında beta-Laktamaz Kaynaklı Direncin Moleküler Karakterizasyonu, *Mikrobiyol Buli*, , 48(3): 365-376
- KOH TH., WANG GCY., AND SNG LH. (2004) IMP-1 and a novel metallo-(β -lactamase, VIM6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother*;48:2334-2336.

- LAURETTI L., RICCIO ML., MAZZARIOL A., COMAGLIA G., AMICOSANTE G., FONTANA R., AND ROSOLLINI GM. (1999) Cloning and characterization of blaVIM, a new integron borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*;43:1584-1590.
- LEE K, KIM CK, HONG SG. (2010). Characteristics Of Clinical Isolates Of *Acinetobacter* Genomespecies 10 Carrying Two Different Metallo- β -Lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, 36(3), 259-63
- LEE K, LIM YS, YONG D, YUM JH, CHONG Y. (2003) Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo- β -lactamase producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*; 41: 4623-9.
- LEE K, YUM JH, YONG D, LEE HM, KIM HD, DOCQUIER JD, ROSSOLINI GM, CHONG Y. (2005) Novel Acquired Metallo- β -Lactamase Gene blaSIM-1 in a Class 1 Integron from *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*; 49: 4485-91.
- LEE K. CHONG Y. SHIN HB et al. (2001) Modified hodge test and EDTA disk synergy test to screen metallo- β -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*; 7: 88-91.
- LIVEMIORE D.M. & WILLIAMS, J.D. (1996) . (3-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. in Lorian V Ed, pp. . Williams and Wilkins, Baltimore.;50278.
- LIVERMORE DM. (2000) Epidemiology of antibiotic resistance. *Intensive Care Medicine*.; 26:14-21.
- LIVERMORE DM. (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, our worst nightmare *Clinical infectious diseases*.;34:634-40.
- LIVERMORE DM (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microb Rev*;8:557-84.
- LIVERMORE DM., DAREK F., BROWN J. (2005) .Detection of β -lactamase-mediated resistance.
- MARAGAKIS LL, PERL TM. (2008) *Acinetobacter baumannii*: Epidemiology, antimicrobial resistance, and treatment options. *Clin Infect Dis*; 46(8): 1254-63.
- MAY TB, SHINABARGER D, MAHARAJ R, KATO J, CHU L, DEVAULT JD, ROYCHOUDHURY S, ZIELINSKI NA, BERRY A, ROTHMEL RK, MISRA TK, CHAKRABARTY AM. (1991) Alginate synthesis by *Pseudomonas aeruginosa*: a key pathogenic factor in chronic pulmonary infections of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Rev*; 4: 191-206.
- MCGOWAN JE. (2006) Resistance in nonfermenting gram negative bacteria: multidrug resistance to the maximum. *Am J Med*;119:29-36.
- MEDEIROS AA. (1984) ; (3-lactamases. *Br Med Bull* 40:18-27.
- MEDEIROS AA. (1997) (3-lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect*;3(Suppl4):2-9.

- MİGLİAVACCA R, DOCQUIER JD, MUGNAIOLÌ C et al. (2002) Simple microdilution test for detection of metallo-beta-lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Microbiol*; 40: 4388-90.
- MORFİN-OTERO R, TİNOCO-FAVILA JC, SADER HS, SALCİDO-GUTİERREZ L, PEREZ-GOMEZ HR, GONZALEZ-DÍAZ E, PETERSEN L, RODRÍGUEZ-NORİEGA E: (2012). Resistance trends in gram-negative bacteria: surveillance results from two Mexican hospitals, 2005–2010. *BMC Research Notes*, 5: 277,
- NEGRİ MC, MORROSSİNİ MI., BLAZQUEZ J., BACQUERO F. (2000) Antibiotic resistance in hospital infections:the role of newer cephalosporins. *Clin Microb Infect*;6(suppl3):95-7.
- NORDMANN P, POİREL L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect*;8:321-33.
- NOYAL MJC, MENEZES GA, HARİSH BN, SUJATHA S, PARİJA SJ. (2009) Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinicalisolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res*; 129: 707-712.
- OH E, LEE S, PARK Y, PARK J, PARK K, KİM S et al. (2003) Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-beta-lactamase. *J. Microbiol. Methods*.;54:411-418.
- ONGURU P, ERBAY A, BODUR H, BARAN G, AKİNCİ E, BALABAN N, CEVİK MA: (2008). Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors for nosocomial infections. *Journal of Korean medical science*, 23: 982-7,
- OTKUN M. (1998) Diğer Enterik bakteriler ve *Pseudomonas* türleri. İçinde Serter D, Ertem E, Gökengin D. Editörler. Başlıca Bakteriyel, Paraziter ve Mikotik Enfeksiyon Hastalıkları. İzmir: Nobel Tıp Kitabevi:. pp.253-263.
- ÖZTÜRK R. (2002) Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu. *Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumda Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*; 31: 83-100.
- PANTOPHLET RA. (2008). Lipopolysaccharides Of *Acinetobacter*, In: Gerischer U (Ed), *Acinetobacter Molecular Biology*. Caistr Academic Press, Norfolk, Uk, Pp: 61-98.
- PATEL JB, RASHEED JK, KİTCHEL B. (2009) Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clinical Microbiology Newsletter*; 31: 55-62.
- PATZER J., TOLEMAN MA., DESHPANDE LM., KAMİNSKA W, DZIERZANOWSKA D., BENNETT PM, JONES RN, AND WALSH TR. (2004) *Pseudomonas aeruginosa* strains harbouring an unusual bla_VM-4 gene cassette isolated from hospitalized children in Poland (19982001). *J Antimicrob Chemother*;53:451-456.
- PEIX A, RAMİREZ-BAHENA MH, VELAZQUEZ E: (2009) . Historical evolution and current status of the taxonomy of genus *Pseudomonas*. *Infection, Genetics and Evolution*, 9: 1132-47,

- PELEG AY, SEIFERT H, PATERSON DL. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence Of A Successful Pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 21(3):538-82.
- PÍCAO RC, ANDRADE SS, NÍCOLETTÍ AG, et al. (2008) Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM, SPM or VIM producing isolates. *J Clin Microbiol*;46(6):2028-37.
- PÍTOUT J, GREGSON D, POÏREL L, MCCLURE J, LE P, CHURH D. (2005) Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing Metallo- β -Lactamases in a large centralized laboratory, *Journal of Clinical Microbiology*,; 43: 3129-3135.
- PÍTOUT JDD, CHOW BL, GREGSON DB, LAUPLAND KB, ELSAYED S, CHURCH DL: , (2007). Molecular epidemiology of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the Calgary Health Region: emergence of VIM-2-producing isolates. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45: 294–298
- PİTT TL. (1989) Lipopolysaccharide and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiot Chemother*; 42: 1-7.
- QU T, ZHANG J, WANG J, et al. (2009) Evaluation of phenotypic tests for detection of metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains in China. *J Clin Microbiol*;47:1136-42.
- QUE VJ, WOODS DE. (1987) Alteration of lung structure and function by *Pseudomonas aeruginosa*. *Pathol Immunopathol Res*; 6: 93-102.
- QUÍRAGO ML, FRANCESCHİNÍ N., ROSSOLİNÍ GM., GUTKİND G., BNFİGLİO G., FRANCHİNO L., AND AMÍCOSANTE G. (2000) Interaction of cefotetan and the metallo- β -lactamases produced in *Aeromonas* spp. and invitro activity. *Chemotherapy*;46:177-183.
- RASMUSSEN BA., AND BUSH K. (1997) Carbapenem-hydrolyzing β -lactamases Antimicrob Agents Chemother;41:223-232
- Rossolini GM., Conde mi MA., Pantanella F., Docquier JD., Amicosante G., and Thaller MC. Metallo- β -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:837-844.
- SCHRECKENBERGER PC, DANESHVAR MI, HOLLİS DG. (2008). *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Chryseobacterium*, *Moraxella* ve Diğer Nonfermentatif Gram-Negatif Basiller. *Manual Of Clinical Microbiology*. Murray, PR, Baron EJ, Pfaller MA, Jorgensen JH, Landry ML. 9. Baskı. Ankara: Atlas Yayıncılık. S: 770-802.
- SCHRECKENBERGER PC, GRAEVENİTZ A. (2003). *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium*, And Other Nonfermentative Gram Negative Rods. In: Murray Pr, Baron Ej, Pfaller Ma, Tenover Fc, Tenover Fc, Tenover Fc, Tenover Fc, Tenover Fc, Tenover Fc, Tenover Fc (Eds.). *Manual Of Clinical Microbiology*. 7 Th Ed. Washington Dc: Asm Pres;; 539-60.
- SEIFERT HR, BAGİNSKİ A, SCHULZE P. (1993). The Distribution Of *Acinetobacter* Species İn Clinical Culture Materials. *Zentralbl Bakteriol*, 279: 544-552

- SESLİ-ÇETİN E, TETİK T, KAYA S, ARIDOĞAN BC. (2009). *Acinetobacterbaumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* İzolatlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Dört Farklı Fenotipik Yöntemle Araştırılması. *Enfeksiyon Derg*, S. 23(2):51-5.
- SHOJA S , MOOSAVIAN M, ROSTAMİ S, FARAHANİ A, PEYMANİ A, AHMADI K, EBRAHİMİFARD N. (2017). Dissemination Of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* in Patients With Burn Injuries. *Journal Of The Chinese Medical Association* 80(245)-252
- SHU JC, SU LH, CHİA JH, HUANG SH, KAO YC, LEE SC, WU TL: (2012). Identification of a hidden outbreak due to the spread of a VIM-3-producing, extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (XDRPA) clone at a regional hospital in Taiwan. *Epidemiology and Infection*, 1-4,
- SOKOL PA, IGLEWSKİ BH, HAGER TA, SADOFF JC, CROSS AS, MC MANUS A, FERBER BF, IFLEWSKİ WJ. (1981) Production of exoenzyme S by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun*; 34: 147-153.
- SOULİ M, GALANİ I, GİAMARELLOU H. (2008) Emergence of extensively drug-resistant and pandrug-resistant Gram-negative bacilli in Europe. *Euro Surveill*; 13(47).
- SPENCER J., CLARKE AR., AND WALSH TR. (2001) Novel mechanism of hydrolysis of therapeutic β -lactams by *Stenotrophomonas maltophilia* L1 metallo-p-lactamase. *J Biol Chem*;276:33638-33644.
- STRATEVA T, OUZOUNOVA-RAYKOVA V, MAROVA B, TODOROVA A, MARTEVA Y, MİTOV I. (2007) Problematic clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from the university hospitals in Sofia, Bulgaria: current status of antimicrobial resistance and prevailing resistance mechanism, *Journal of Medical Microbiology*,; 56: 956-963.
- STRATEVA T, YORDANOV D: (2009) *Pseudomonas aeruginosa*-a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, , 58: 1133–1148.
- THOMPSON JS., AND MALAMY MH. (1991) Sequencing of the gene for an imipenem cefoxitin-hydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus* p-lactamase BCII. *J Bacteriol* 72:2584-2593.
- TİJET N, PATEL SN, MELANO RG. (2016). Detection Of Carbapenemase Activity in Enterobacteriaceae: Comparison Of The Carbapenem Inactivation Method Versus The Carba Np Test. *J Antimicrob Chemother*, 71(1):274-6
- TOMARAS AP, DORSEY CW, MCQUEARY CN, ACTİS LA. (2008). Molecular Basis Of *Acinetobacter* Virulence and Pathogenicity, In: Gerischer U (Ed), *Acinetobacter Molecular Biology*, Caistr Academic Press, Norfolk, Uk, Pp: 265-97.
- TOWNER KJ. (2009). *Acinetobacter*: An Old Friend, But A New Enemy. *Journal Of Hospital Infection*, 73, 355-363
- ULUSOY AL M, MUMCUOĞLU İ, DOLAPÇI İ, KARAHAN ZC, BARAN I, KURŞUN Ş. (2011). İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması, *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 41(1):29-36,

- URBAN C, SEGAL-MAURER S AND RAHAL JJ. (2003) Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 36: 1268–74.
- VAHABOĞLU H, AKHAN SÇ. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer *Pseudomonas* türleri. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi; pp.1608-1024.
- WALSH TR, TOLEMAN MA, POİREL L, NORDMANN P. (2005) Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev*;18:306-25
- WALSH TR., TOLEMAN MA., POİREL L., NORDMANN P. (2005) Metallo-p-lactamases: the quiet before the storm *Clin Microbiol Rew*;18(2):306-321.
- WIEDEMANN Bİ DİETZ H, PREİFLE D. (1998) Induction of blactamasein *Enterobacter aerogenes* *Clin Infect Dis*;27 (Suppl):42-7.
- WİNN J, STEPHEN A, WİLLIAM J, ELMER K, GARY P, SCHRECKENBERGER P. (2006) . *Gail Woods Koneman's Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology* Washington. Altıncı Baskı, Lippincott Williams & Wilkins:353-355
- WİSPLİNGHOFF HH, PAULUS TT, LUGENHEİM MM, STEFANİK DD, HİGGİNS PG, EDMOND MB, WENZEL RP, SEİFERT H. (2012). Nosocomial Bloodstream İnfections Due To *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Pittii* and *Acinetobacter Nosocomialis* in The United States. *J. Infect*, 64, 282–290.
- WOODS DE, SOKOL PA, BRYAN LE, STOREY DG, MATTİNGLY SJ, VOGEL HJ, CERİ H. (1991) In vivo regulation of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* associated with genetic rearrangement. *J Infect Dis*; 163: 143-149.
- WOODS DE, SOKOL PA. (1985) Use of transposon mutants to asses the role of exoenzymes S in chronic pulmonary disease due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Eur J Clin Microbiol*; 4: 163-169.
- Wretlind B, Paulovskis OR. *Pseudomonas aeruginosa* elastase and its role in *Pseudomonas* infection. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 998-1004.
- YAGCI A, TUNC Y, SOYLETİR G. (2002) Elastase and alkaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* strains: comporasion of two procedures. *New Microbiol*; 25: 223-229.
- YAN J, WU J, TSAİ S, CHUANG C. (2004) Comparison of the double disk, combined disk and Etest methods for detecting metallo-betalactamases in gram-negative bacilli. *Diag. Microbiol. Infect. Dis.*;49:5-11.
- YANIK S. (2003) Klinik Örneklerden İzole Edilen Gram Negatif Çomaklarda B-Laktamaz Aktivitesi Ve Antibiyotiklere Direnç Durumları İÜ CTF Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. Uzmanlık Tezi

YANO H., KUGA A., OKAMATO R., KITASATO H., KOBAYASHI T., (2001) Inoue M. Plasmid encoded metallo-lactamase (IMP6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* ;45:1343-8.

YONG D, LEE K, YUM JH, SHIN HB, ROSSOLINI GM, CHONG Y. (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*; 40: 3798-801.

YONG D, LEE K, YUM JH. (2002) Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*; 40: 3798-3801.

YOON SS, COOKLEY R, LAU GW, LYMAR SV, GASTON B, KARABULUT AC, HENNINGAN RF, HWANG SH, BUETTNER G, SCHURR MJ, MORTENSEN JE, BURNS JL, SPEERT D, BOUCHER RC, HASSETT DJ. (2006) Anaerobic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* acidified nitride derivatives under cystic fibrosis airway conduction. *J Clin Invest*; 116: 436-446.

ZHAO WH, HU ZQ: (2010) .Beta-lactamases identified in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Critical Reviews in Microbiology*, 36: 245-58,

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Hatice ÇINAR

Doğum Yeri ve Tarihi: Afyonkarahisar/Merkez 1993

Yabancı Dili: İngilizce

İletişim (Telefon/e-posta) : 0553 285 57 64 / haticecinar03@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lise: Anafartalar Anadalo Lisesi

Lisans: Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü

Yayınları (SCI ve diğer): Yok

