

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEM DİRENÇLİ PSEUDOMONAS SUŞLARINDA  
OXA-23, OXA-40, OXA-58  
GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE TESBİTİ

DR.FATMA ESENKAYA TAŞBENT

UZMANLIK TEZİ

KONYA 2014

T.C.  
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ  
MERAM TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

KARBAPENEM DİRENÇLİ PSEUDOMONAS SUŞLARINDA  
OXA-23, OXA-40, OXA-58  
GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE TESBİTİ

DR.FATMA ESENKAYA TAŞBENT

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN: DOÇ.DR. MEHMET ÖZDEMİR

KONYA 2014

## TEŞEKKÜR

Asistanlığım süresince bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum ve anabilim dalı başkanlığını yürüten saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Bülent BAYSAL'a ve Prof. Dr. Mahmut BAYKAN'a, her konuda yardımını, bilgisini esirgemeyen çok değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet ÖZDEMİR'e, çeşitli konularda bana faydalı olan Yrd. Doç. Dr. Bahadır FEYZİOĞLU'na, Yrd. Doç. Dr. Metin DOĞAN'a; tez çalışmam sırasında çok büyük bir sabırla bana yardımcı olan Biyolog Duygu DALKILIÇ'a, tezimi 12151800 no'lu proje ile destekleyen Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü yöneticilerine, birlikte çalıştığım asistan arkadaşlarıma, tüm mikrobiyoloji laboratuvarı teknisyen ve personeline teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca tüm hayatım boyunca her türlü emeğini, desteğini ve sevgisini koşulsuz sunan sevgili anneme ve babama, gösterdiği sabır, sevgi ve saygı için sevgili eşim Uzm. Dr. İlker Taşbent'e ve çocuklarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Fatma ESENKAYA TAŞBENT

## ÖZET

### KARBAPENEM DİRENÇLİ PSEUDOMONAS SUŞLARINDA OXA-23, OXA-40, OXA-58 GENLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLE TESBİTİ FATMA ESENKAYA TAŞBENT

#### UZMANLIK TEZİ

KONYA-2014

**Amaç:** Bu çalışmada, karbapenem dirençli 184 *Pseudomonas* spp. suşunda, OXA tipi karbapenemaz (OXA-23, OXA-40, OXA-58) üretiminin ve karbapenem direncine katkısının irdelenmesi hedeflendi.

**Yöntem:** Kasım 2011 ile Ekim 2013 tarihleri arasında, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen klinik örneklerden izole edilen 184 karbapenem dirençli *Pseudomonas* spp. suşu çalışmaya alındı. Klinik izolatların tiplendirmesi ve antimikrobial duyarlılıkları otomatize sistem (VITEK 2, Biomerieux, Fransa) ve konvansiyonel yöntemler ile yapıldı. Karbapenem direnci saptanan klinik örneklerde, Hyplex CarbOxa ID (Amplex Diagnostics GMBH, Almanya) PZR ticari kiti ile OXA karbapenemazlardan OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 varlığı araştırıldı.

**Bulgular:** 184 örnekten 12'sinde OXA-23 pozitifliği saptanırken, OXA-40 ve OXA-58 genlerinden birer pozitiflik bulundu.

**Sonuç:** Bu çalışma bölgemizde ve Türkiyede *Pseudomonas* suşlarında OXA gurubu karbapenemazları araştıran ve oranlarını ortaya koyan ilk araştırmadır. Karbapenem direncinde en önemli mekanizma, karbapenemaz aracılı enzimatik hidroliz mekanizmasıdır ve bu mekanizma *Acinetobacter baumannii*'de olduğu gibi *Pseudomonas*'larda da bulunurlar. OXA karbapenemazların çoğu zayıf karbapenemaz aktivitesi gösterebilir de; karbapenem direnci OXA karbapenemazlar ile ikinci bir direnç mekanizmasının kombinasyonundan kaynaklanabilir. Gelecekte karbapenem direnci hasta tedavisinde ciddi bir sorun haline gelebilir.

**Anahtar kelimeler:** *Pseudomonas*, OXA, karbapenemaz, direnç.

## ABSTRACT

### DETECTION OXA-23, OXA-40, OXA-58 GENES WITH MOLECULAR INVESTIGATION IN CARBAPENEM RESISTANT PSEUDOMONAS STRAINS FATMA ESENKAYA TAŞBENT KONYA-2014

**Objective:** It was aimed to determine OXA type carbapenemases (OXA-23, OXA-40, OXA-58) production in 184 carbapenem resistant *Pseudomonas* spp. isolates and to evaluate its contribution to carbapenem resistance.

**Method:** One hundred eighty four carbapenem resistant *Pseudomonas* spp. isolates were collected from Medical Microbiology Laboratory of Meram Faculty of Medicine, Necmettin Erbakan University between November 2011 and October 2013. Identification and antimicrobial susceptibilities of clinical isolates were determined by automated system (VITEK 2 Compact, Biomerieux, France) and conventional methods. OXA-23, OXA-40 and OXA-58 of OXA carbapenemases was determined by a commercial kit Hyplex CarbOxa ID (Amplex Diagnostics GMBH, Germany) PCR in carbapenem resistant clinical samples.

**Result:** 12 of the 184 isolates have OXA-23 genes, OXA-40 and OXA-58 genes were determined only one isolate.

**Conclusion:** This is first investigation of OXA type carbapenemases genes in *Pseudomonas* strains and determine the rates of these genes in our region and Turkey.

The most important mechanism of carbapenem resistance is the enzymatic hydrolysis mediated by carbapenemases. These enzymes are usually OXA type carbapenemases and also found in carbapenem-resistant *Pseudomonas*. Although most of OXA carbapenemases have weak carbapenemase activity, carbapenem resistance may result from the combination of a second mechanism of resistance. Carbapenem resistance could become a serious problem in the patient treatment in the future.

**Key Words:** *Pseudomonas*, OXA, carbapenemase, resistance

## İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
TABLO DİZİNİ.....	viii
ŞEKİL DİZİNİ.....	ix
KISALTMALAR VE SİMGELER.....	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Antibiyotikler.....	6
2.1.1 Beta-laktam antibiyotikler.....	8
2.1.1.1 Karbapenemler.....	9
2.2 Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	12
2.2.1 Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	14
2.2.1.1 Karbapenemlere direnç mekanizmaları.....	21
2.2.2 <i>Pseudomonas</i> 'larda direnç mekanizmaları.....	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	27
3.1 Tür tayini ve karbapenem direncinin belirlenmesi.....	27
3.1.1 Kullanılan besiyerleri.....	27
3.2 OXA genlerinin multipleks PZR ile belirlenmesi.....	29
3.2.1 Kültür plaklarından DNA izolasyonu.....	30
3.2.2 Multipleks PZR amplifikasyonu.....	31
3.2.3 Hibridizasyon çalışması.....	32

<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>36</b>
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>40</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>47</b>
<b>7. KAYNAKLAR.....</b>	<b>48</b>

## TABLÖLAR

**Tablo 2.1.** Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması

**Tablo 2.2.** Karbapenemlerin aktivitetlerine göre sınıflandırılması

**Tablo 2.3.** İmipenem ve meropenemin *Pseudomonas aeruginosa* için MİK değerleri

**Tablo 2.4.** Çeşitli antibiyotiklerin klinik kullanıma girdikleri ve direncin bildirildiği tarihler

**Tablo 2.5.** Beta Laktamazların Sınıflandırılması

**Tablo 4.1.** OXA-23, OXA-40, OXA-58 pozitifliği saptanan hastaların demografik verileri

**Tablo 4.2.** Karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının izole edildiği kliniklerin dağılımı

**Tablo 4.3.** Karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının izole edildiği klinik materyal

**Tablo 4.4.** OXA-23, OXA-40, OXA-58 genlerinin bulunma sıklığı



## ŞEKİLLER

**Şekil 2.1.** Beta-laktam halkası bulunduran antibiyotikler

**Şekil 2.2.** Çeşitli etkenlere göre beta laktam antibiyotiklerin kronolojik dağılımı

**Şekil 2.3.** Beta laktamazların yıllara göre sayılarındaki artış

**Şekil 2.4.** OXA karbapenemazların dendrogramı

**Şekil 3.1.** Plate üzerinde gen bölgelerine ait kuyucukların görüntüsü

**Şekil 3.2.** Mikroplakta OXA-23 pozitifliğinin görüntüsü

**Şekil 3.3.** Mikroplakta pozitif kontrolün görüntüsü

**Şekil 3.4.** Mikroplakta OXA-40 pozitifliğinin görüntüsü

**Şekil 5.1.** Sınıf D beta-laktamazların temsilcilerinin dendrogramı

## **KISALTMALAR VE SİMGELER**

**ABD:** Amerika Birleşik Devletleri

**BAL:** Bronkoalveoler lavaj

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**EARSS:** European Antimicrobial Resistance Surveillance System

**EGNB:** Enterik Gram Negatif Bakteri

**EMB:** Eozine Methylene Blue agar

**GSBL:** Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

**IMP:** Imipenem

**KHO:** Karbapenem Hidrolize eden Oksasilinazlar

**MBL:** Metallo Beta Laktamazlar

**MEM:** Meropenem

**MİK:** Minimal inhibisyon konsantrasyonu

**PBP:** Penisilin bağlayan protein

**PZR:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu

**YBÜ:** Yoğun Bakım Ünitesi

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Gram negatif, nonfermentatif, oksidaz pozitif bir basil olan *Pseudomonas* türleri, hastane ortamında sık görülmesi, mortalitesi yüksek infeksiyonlara neden olması ve birden fazla antibiyotik grubuna farklı mekanizmalarla direnç geliştirebilmesi nedeniyle hastane infeksiyonu etkenleri arasında önemli bir yere sahiptir (Arman 2004).

Birçok antibiyotiğe doğal olarak dirençli olmasının yanı sıra mutasyon ile tüm tedavilere dirençli hale gelebilmesi ve son yıllarda tedavide kullanılacak tüm antibiyotiklere dirençli “panrezistan ” kökenlerin ortaya çıkması, *Pseudomonas*’ların hastane infeksiyonlarında en önemli bakterilerden biri olmasında etken olmuştur (Gür 2003).

*Pseudomonas*’lar birçok antibiyotiğe karşı doğal olarak dirençlidir. Ayrıca yüksek oranda kazanılmış direnç geliştirebilme yeteneğine sahiptir. Bu nedenle tedavisi güç olan ve hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonlara neden olmuştur (Defez 2004, Falagas 2006). Tüm dünyada bakterinin antibiyotiklere karşı geliştirdiği kazanılmış direnç oranları giderek artmaktadır (Aloush 2006). Direnç gelişimi özellikle spesifik antibiyotik kullanımı sonrası gelişmekte ve dirençli suşlar hastadan hastaya geçebilmektedir. Son yıllarda, *P.aeruginosa* suşlarının geliştirdiği çoklu antibiyotik direnci dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmiştir (Pier 2005).

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal bir ajanın öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı koyabilme yeteneğidir. Antibiyotik direnci, yalnızca yaygın antibiyotik kullanımı sonucu değil, bakterilerin olumsuz çevre koşullarında yaşamlarını sürdürmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçasıdır (Cunha 2000).

Karbapenemler bilinen en geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiklerdir. Geniş etki spektrumları ve dirençli bakterilerle oluşan ciddi infeksiyonlarda tercih edilmeleri nedeniyle karbapenem grubu antibiyotikler, çoğul antibiyotik direnci gösteren etkenler ile oluşan hastane infeksiyonları ve birden fazla etkenin neden olduğu komplike infeksiyonlar için ayrılması ve rutin kullanımından kaçınılması gereken antibiyotiklerdir. Son yıllarda, karbapenem grubu antibiyotiklere dirençli *Pseudomonas* suşları ile meydana gelen infeksiyonların sıklığında anlamlı bir artış görülmüş ve tedavilerinde önemli sorunlar yaşanmıştır (Bonfiglio 2002, Özgüven 2002, Akalın 2004).

Karbapenemin de dahil olduğu beta laktam grubu antibiyotiklere direnç gelişmesinden sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisi, bakterilerin ürettiği beta-laktamaz enzimleridir. Karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazlar (karbapenemazlar) karbapenem kullanımına paralel olarak son yıllarda artan oranlarda bildirilmektedir (Gönüllü 2003). Beta-laktamazların

sınıflandırılmasında en çok Bush-Jacoby-Medeiros ve Ambler sınıflandırmaları kullanılmaktadır (Rice 2003).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında kullanılan Ambler sınıflandırması ile beta laktamazlar dört gruba ayrılır. Karbapenemazlar Ambler sınıflamasındaki üç grupta da yer alırlar:

Sınıf A karbapenemazlar (KPC, GES, SME...)

Sınıf B metallo- $\beta$ -laktamazlar (IMP, VIM, SPM, NDM-1...)

Sınıf D OXA-23, -40, -51, -58, -48 (Bush 1995, Poirel 2002).

Günümüzde tüm dünyada bir yandan hızla yeni ilaçlar geliştirilmekte iken, öte yandan bunlara süratle direnç kazanan mikroorganizmalarla oluşan infeksiyonlar bildirilmektedir. Antibiyotik kullanımı ile bakteriyel direnç gelişimi arasındaki ilişki uzun zamandan beri dikkat çekmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar yaygın kullanım ile direnç gelişimi arasında bir paralellik olduğunu göstermektedir (Özgüven 2002).

Antibiyotiklere direnç, tüm dünyada insan sağlığını tehdit eden en önemli sorunlardan biridir. Bakterilerde son yirmibeş yıldır çok sayıda direnç fenotipi ortaya çıkmış ve yaygın hale gelmiş, çoklu dirençli mikroorganizmalar sadece hastanelerde değil toplumda da görülmeye başlanmıştır. Direncin biyokimyasal mekanizmalarının bilinmesi in-vitro olarak direnç fenotiplerinin belirlenebilmesi ve tedaviye yön göstermenin yanında dirence karşı koyabilen veya bakterilerde farklı hedefleri olan yeni antibiyotiklerin geliştirilmesine de temel oluşturmaktadır. Bu direnç mekanizmalarının bilinmesi ve yayılımının önlenmesi önemlidir.

Karbapenemaz üreten bakterilerin neden olduğu, özellikle hayatı tehdit eden ciddi infeksiyonların tedavisinde antibiyotik kullanımı ve sonuçları hakkında yeterince klinik veri bulunmamaktadır (Livermore 2001).

Bu çalışma ile laboratuvarımıza gelen rutin örneklerdeki karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarında grup D karbapenemaz ailesinden direnç genleri polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Bu direnç genleri daha sıklıkla *Acinetobacter*'de rastlanmakta olup bununla ilgili çok sayıda çalışma bulunurken, *Pseudomonas*'larda bu direnç genleriyle ilgili çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu çalışmanın bu yönde katkı sağlayacağı düşünülmektedir. Çalışmaya dahil edilen karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarında, karbapenem direncine neden olduğu düşünülen genlerden OXA-23, OXA-40, OXA-58 genlerinin varlığının araştırılması planlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

*Pseudomonadaceae* familyası içerisinde yer alan *Pseudomonas* cinsi bakterilerin birçoğu doğada, toprakta ve sularda yaygın olarak bulunur. *Pseudomonas* Gram-negatif bakteri cinsi olup, pek çok tür içerir (Bilgehan 2000, Murray 2007).

Bu bakterilerin sınıflandırılması görünümüne, pigment oluşturup oluşturmamalarına ve metabolizmalarına göre yapılmıştır. *Pseudomonas* cinsinin, ribozomal RNA/ DNA hibridizasyon çalışmaları sonucunda birbirinden ilişkisiz beş gruptan oluştuğu belirlenmiştir. *Pseudomonas* ve yakın bakterilerin rRNA homoloji grupları:

1. *Pseudomonas*
2. *Burkholderia* türleri;
3. *Comamonas*, *Acidovorax* ve *Hydrogenophaga* genusları
4. *Brevundimonas* türleri
5. *Stenotrophomonas* ve *Xanthomonas* cinsleridir (Bilgehan 2000, Murray 2007).

Günümüzde *Pseudomonas* cinsi içinde 160 tür bulunur ve bunlar içinde sadece 12 tür klinik öneme sahiptir. Çoğu türler bitki ve hayvan için patojendir. *Pseudomonas* cinsinde en sıklıkla izole edilen insan patojeni, *Pseudomonas aeruginosa*'dır (Baştürk 2005, Murray 2007).

*Pseudomonas aeruginosa* ilk kez Gessard tarafından 1882 yılında mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır (Bilgehan 2000). 1886 yılında yeni doğan kanında, 1899 yılında ise yetişkin kanında infeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 19. yüzyılın sonunda insanın hemen hemen tüm anatomik bölgelerinden infeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 1980'lerden sonra hastane infeksiyon etkeni olarak dikkat çekmeye başlamıştır (Kayse 1997).

*Pseudomonas* türleri aerob, sporsuz, düz veya hafif kıvrımlı, 0.5-1.0 µm ve 1.5-5.0 µm boyutlarında Gram-negatif çomaklardır. Tek veya çoklu polar flajellaları ile genellikle hareketlidirler. Son oksijen alıcısının oksijen olduğu zorunlu aerob solunuma dayalı bir metabolizmaları olmakla birlikte, bazı durumlarda nitratın son elektron alıcısı olarak kullanılmasına bağlı olarak anaerob şartlarda da üreyebilirler. *Pseudomonas* türleri katalaz pozitif olup, klinik öneme sahip çoğu tür oksidaz pozitifdir (Birkaç tür hariç) (Murray 2007). Gen transferini konjugasyon veya transdüksiyonla yapar ve DNA' daki G+C oranı % 67,2' dir (Bilgehan 2000).

Üremek için otuzdan fazla organik maddeyi kullanırlar, en iyi 37°C'de ürerler. *Pseudomonas aeruginosa* ve diğer türler 42°C'de de ürerler; fakat 4°C'de üremezler (Gür 2003, Koneman 2006).

Bu bakteriler, katı besiyerlerinde başlıca 3 tip koloni oluşturur:

Tip 1 koloniler; yuvarlak, mat yüzeyli, ortası kabarık, 2-3 mm çapındaki kolonilerdir ve klinik materyallerden üretilen *P. aeruginosa*'lar daha çok bu tip kolonileri oluştururlar.

Tip 2 koloniler; küçük, kabarık, koliform kolonilere benzerdir.

Tip 3 koloniler ise R koloni formundadır.

Bu formların dışında mukoid, cüce, jelatinöz koloniler de görülebilir. Mukoid koloniler, sıklıkla kistik fibrozisli hastalarda görülmekle birlikte, bazen diğer kronik akciğer hastalığı olan kişilerdeki pulmoner infeksiyonlarda veya kateter kullanımına bağlı sekonder gelişen üriner sistem infeksiyonlarında da görülebilirler. Sıklıkla kistik fibrozisli hastaların balgamından izole edilen cüce koloniler, 48-72 saat inkübe edilmeden gözle değerlendirilemezler (Pitt 1998; Bilgehan 2000; Kıska 2003).

*Pseudomonas*'lar, bir kültürde koloni varyantlarının bir karışımını oluşturabilir ve karışık bir bakteri kültürü izlenimi verebilir. Bu koloni tipleri, farklı biyokimyasal özellik ile enzimatik aktiviteye ve farklı antibiyotik duyarlılık paternine sahip olabilir. Özellikle kistik fibrozisli hastalarda sıklıkla görülen bu karışık koloni varyantları antibiyotik duyarlılık testlerinde sorun oluşturabilir (Kıska 2003).

MacConkey agarda, laktoz negatif koloniler oluştururken, buyyonda yüzeyde zar yapmak üzere bol ve homojen ürer, zarın hemen altında mavi-yeşil pigment oluşumu görülür (Bilgehan 2000; Forbes 2002; Kıska 2003). Bu özellik *P. aeruginosa* identifikasyonunu doğrular ve kültürlerin çoğunda, triptofandan 2-aminoasetofenon üretimine bağlı olarak tatlı üzüm benzeri koku oluşturması karakteristik özelliğidir (Pitt 1998; Erdem1999).

Mueller-Hinton agar veya triptik soy agar gibi boya içermeyen besiyerlerinde değerlendirilen pigmentasyon oluşumu, kültürler inkübatörden çıkarılıp oda ısısında (18-22 °C) 3-4 saat bekletildiğinde artmaktadır (Pitt 1998; Bilgehan 2000; Forbes 2002).

*Pseudomonas*'lar, karbonhidratları fermente etmez. Glikoz ve ksilozu, oksidasyon yoluyla parçalar fakat maltoza etkisizdir. Katalaz ve oksidaz testleri pozitifdir. L- arjinin dihidrolaz üretiminin, L-lizin dekarboksilaz ve L-ornitin dekarboksilaz üretiminin negatif olması, indol ve H<sub>2</sub>S oluşturmaması, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testlerinin negatif olması, jelatini hidrolize etmesi, üreyi parçalaması, sitratı kullanabilmesi ve nitratın gaz oluşturması, üç şekerli demirli (TSI) besiyerinde reaksiyon oluşturmaması gibi özellikleri tanıda yardımcı olan diğer biyokimyasal testlerdir (Gür 2003, Koneman 2006, Topçu 2008).

Bakterinin hastalık yapma kapasitesini gösteren virülans faktörleri, bakteriyi konak immun savunmasından koruyan, dokuda kolonizasyona ve/veya invazyona neden olan hücre dışı enzimler ve/veya hücre yüzeyine bağlı etmenler olarak tanımlanabilmektedir (Nguyen

2006). Kolonizasyon sonrasında üretilen tüm bu virülans etmenlerinin, bakteriyel infeksiyonların yayılmasına, kolonizasyondan sonra doku hasarına, kan dolaşımı invazyonuna neden olduğu gösterilmiştir. Bu hücre dışı enzim ve toksinlerin üretimi *Pseudomonas*'ların infeksiyon evresine ve yerleştiği yere göre değişmektedir (Williams 2002, Delden 1998). *P. aeruginosa*; türe özgü hücre dışı virülans etmenleri olan elastaz, alkalin proteaz, ekzoenzim S ve ekzotoksin A gibi birçok proteaz ve toksin üretir.

*Pseudomonas*'lar, yüzeysel bir deri infeksiyonundan fulminan sepsise kadar değişen çok çeşitli infeksiyonlara neden olabilir (Murray 2007). Bu infeksiyonlar, yüksek mortalite ile seyrederek (Vahaboğlu 2000).

Farklı fiziksel koşullara çok kolay uyum göstermesi, birçok antibiyotiğe ve dezenfektanlara dirençli olması etkili bir fırsatçı patojen olma özelliği kazandırır (Pollack 2000; Turgut 2002).

*Pseudomonas*'lar sık olmamakla birlikte sağlıklı insanların normal florasında da bulunur. Doğada olduğu gibi vücutta da nemli bölgelerde kolonize olma eğilimindedir. Kolonizasyon oranı; deride %0-2, burun mukozasında %0-3.3, boğaz mukozasında % 0- 6.6, gaitada diyetten etkilenmekle birlikte %2.6-24'tür. Hastanede yatan hastalarda her bir örnekteki kolonizasyon oranı %50'ye kadar çıkmaktadır (Pollack 2000).

Son yıllarda *Pseudomonas* infeksiyonlarının hastane ortamında gittikçe arttığı gözlenmektedir. Değişik çalışmalarda, hastane infeksiyonlarından %8-25 oranında bu bakterinin sorumlu olduğu gösterilmiştir. Özellikle, Yoğun Bakım Üniteleri (YBÜ) ve nütropenik hastaların bulunduğu kliniklerde daha sık olarak görülmektedir (Usluer 2002).

Asya, Avrupa, Latin Amerika ve ABD/Kanada olmak üzere, dünyanın dört farklı bölgesinde 1997-2001 yılları arasında 18569 nonfermentatif Gram-negatif izolatın değerlendirildiği (SENTRY) çalışmasında, *Pseudomonas*'lar %64,5 oranında en sık izole edilen nonfermentatif Gram-negatif basil olarak bildirilmiştir (Jones 2003).

Ülkemizde sekiz hastanenin YBÜ'lerinden izole edilen Gram-negatif bakterilerin değerlendirildiği çok merkezli bir çalışmada, *P.aeruginosa* %24,6 oranı ile en sık izole edilen Gram-negatif bakteri olarak bildirilmiştir (Aksaray 2000). Yine 16 hastanenin YBÜ'lerinden, son 5 yıllık verilerin değerlendirildiği çalışmada ise *P. aeruginosa*'nın %28,2 oranı ile en yaygın Gram-negatif bakteri olduğu belirlenmiştir (Leblebicioğlu 2002).

Saçar ve ark.'nın (2008) 2004, 2005, 2006 yıllarına ait sörveyans çalışmasında, hastane infeksiyonları içinde *P.aeruginosa* %11.3 ile ikinci sıklıkta izole edilmiştir. Yoğun bakım ünitelerindeki hastane infeksiyonlarının araştırıldığı bir diğer çalışmada, infeksiyon etkenleri arasında ilk sırayı %19.7 ile *Pseudomonas spp.* suşları almıştır (Büyüktuna 2010).

Ertürk ve ark.'nın (2012) çalışmasında, yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar araştırılmış, en sık izole edilen (%38) Gram negatif bakteri *Pseudomonas spp.* olarak bildirilmiştir.

Tüm dünyada *Pseudomonas* infeksiyonlarında antibiyotiklere direnç oranları artmakta, kullanılacak antibiyotik sayısı giderek daha da sınırlanmakta ve kullanılacak yeni bir antibiyotik bulunamamaktadır (Quinn 1998; Leblebicioğlu 2002; Eldere 2003). *Pseudomonas*'larda antibiyotiklere direnç hızla ve birden fazla mekanizmayla gelişmektedir (Özsüt 1998). *Pseudomonas* infeksiyonları yıllar içinde artış göstermekte ve özellikle YBÜ'lerinde, kistik fibrozisli veya infeksiyona duyarlı hastalarda ölüme neden olmaktadır (Durupınar 2001).

## 2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler çeşitli mikroorganizma türleri (bakteriler, mantarlar, aktinomiçesler) tarafından sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların gelişmesini engelleyen veya onları öldüren doğal maddelerdir. Antibiyotik terimini ilk defa 1942 yılında Waksman kullanmıştır. Bu terim ilk yıllarda mantar veya bakteri olabilen bir mikroorganizmadan elde edilen ve başka mikroorganizmalara inhibitör olan maddeler için kullanılmıştır. Bu doğal antibiyotiklerin yan dallarında yapılan değişikliklerle elde edilen antibiyotiklere, yarı sentetik antibiyotikler denilmiştir (Tünger 2003, Leblebicioğlu 2008).

Sözcük olarak 'yaşama karşı' (Anti=karşı, Bios=yaşam) anlamına gelen antibiyotikler; doğal, sentetik veya yarı sentetik gibi sınıflandırılabilirler (Topçu 2008).

Antibiyotiklerin bilinçli kullanımı, direnç gelişimi olasılığının azaltılması ve bir antibiyotik grubundan bir çekirdek molekülün yan dallarını değiştirerek yeni yarı sentetik veya sentetik antibiyotiklerin elde edilebilmesi için etki mekanizmalarının bilinmesi gerekir. Antibiyotiklerin bakteriler üzerine etkisi çok defa birden fazla mekanizmayı içerir. Dolayısıyla basit, tekil bir olay değildir. Örneğin; bakteri hücre duvarının sentezini engelleyen bir antibiyotik belirli konsantrasyonlarda ya da bakterinin belirli fizyolojik durumlarında protein veya nükleik asit sentezini de engelleyebilir. Ancak çok defa bu etki mekanizmalarından biri diğerlerinden daha önemlidir ve maddenin antibakteriyel ilaç olarak kullanılmasının asıl nedenini oluşturur. Bu önde gelen etki mekanizmalarına göre de antibakteriyel antibiyotikleri Tablo 2.1' deki gibi beş gruba ayırmak mümkündür (Tünger 2003, Leblebicioğlu 2008).



**Tablo 2.1.** Antibiyotiklerin etki mekanizmalarına göre sınıflandırılması

**1. Hücre duvarı sentezini inhibe edenler**

- Beta-laktam antibiyotikler(penisilinler, sefalosporinler, sefamisinler, **karbapenemler**, oksasefemler, monobaktamlar)
- Glikopeptidler
- Basitrasin
- Fosfomisin
- Sikloserin
- İzoniazid

**2. Protein sentezini inhibe edenler**

- Aminoglikozidler
- Kloromfenikol
- Tetrasiklinler
- Glisilsiklinler
- Makrolidler
- Ketolidler
- Linkozamidler
- StreptoGraminler
- Oksazolidinonlar
- Mupirosin
- Fusidik asit

**3. Nükleik asit sentezini inhibe edenler**

- Kinolonlar
- Rifampisinler
- Novobiyosin
- Dolaylı olarak sülfanamidler
- Nitroforanlar
- Nitroimidazoller

**4. Stoplazma zarını etkileyenler**

- Polimiksinler
- Kolistin
- Gramisidin
- Tirosidin

**5. Folat sentezini etkileyen antibakteriyeller**

- Sülfonamidler
- Trimetoprim
- Dapson

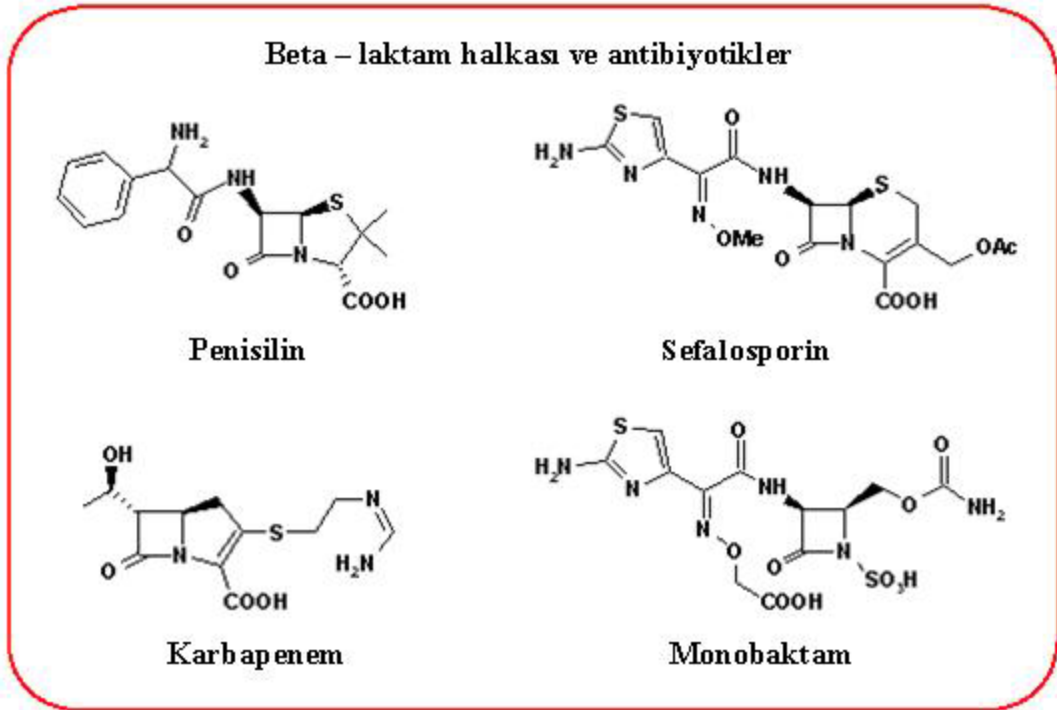
### 2.1.1. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

Bu gruptaki antibiyotiklerin ortak özelliği gruba adını veren dört üyeli bir beta laktam halkası içermeleridir. Bu halkaya bağlanan farklı gruplar her bir beta laktam antibiyotik çeşidine farklı özellikler kazandırmaktadır. Beta-laktam antibiyotikler günümüzde; gerek hastane içinde, gerekse hastane dışında en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında gelmektedirler ve başlıca 5 grupta toplanırlar.

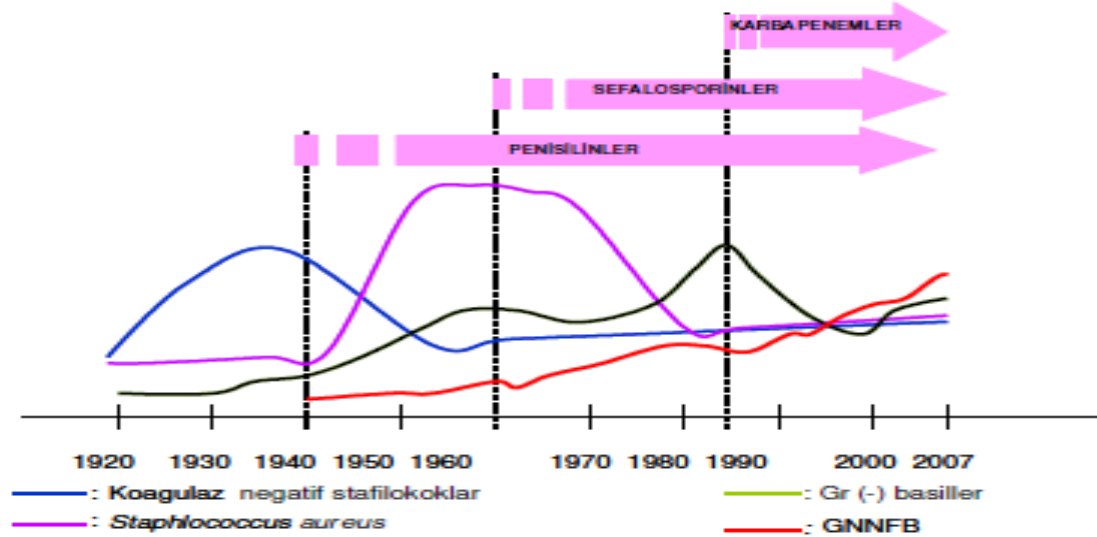
- 1) Penisilinler,
- 2) Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam)
- 3) Sefalosporinler
- 4) Monobaktamlar
- 5) Karbapenemler (Forbes 2002, Tünger 2003, Topçu 2008).

Güvenli olmaları, etki spektrumlarının geniş olması ve kimyasal yapılarında değişikliklerle aktivitelerinin artırılabilmesi nedeniyle beta-laktam antibiyotikler, toplam antibiyotik kullanımının %60'ını oluşturmaktadır (Livermore ve Woodford 2006).

Şekil 2.1. Beta-laktam halkası bulunduran antibiyotikler



**Şekil 2.2.** Çeşitli etkenlere göre beta laktam antibiyotiklerin kullanımının kronolojik dağılımı (Weinstein 1998)



### 2.1.1.1 KARBAPENEMLER

Karbapenemler beta-laktamların en geniş spektrumlusudur. Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar, nadir nonfermentatifler ve *Aeromonas* dışında Gram-pozitif, Gram-negatif ve anaerob mikroorganizmalarla oluşan hastane infeksiyonları ve toplumdan kazanılmış infeksiyonlardaki bakteriyel patojenlere etkilidir (Livermore 2000).

Tıbbi kullanıma girmeleri 1970’li yılların ortalarında tienamisinin bulunmasıyla başlar. Tienamisin bir toprak mikroorganizması olan *Streptomyces cattleya*’dan elde edilmiş üründür. O yıllarda ümitvar bir antibiyotik olarak kabul edilmişken, konsantre formlarında aktivitesini çabuk yitirmesi nedeniyle hayal kırıklığı yaratmıştır. Tienamisinin yarı sentetik bir derivativesi olan N-formimidoil tienamisin (imipenem)’in bu önemli dezavantajı ortadan kaldırdığı saptanmış, ancak bu kez de bu yarı sentetik bileşiğin insan böbrek dehidropeptidaz 1 (DHP-1) enzimi tarafından metabolize edildiği ortaya çıkmıştır. Bu enzim insan böbrek proksimal tüpleri fırçamsı kenarlarında bulunmaktadır ve orijinal imipenem (IMP) molekülünün atılımını azaltmakta, idrarla atılımını engellemektedir. Böylece IMP molekülleri proksimal tübüllerde toksik düzeyde birikerek nekroza yol açmaktadır. Bu önemli problem kısa sürede silastatin molekülünün tanımlanması ile sona ermiştir. Klinik çalışmalar IMP (monohidrat tuzu)/silastatinin 1/1 oranının klinikte kullanılabilir bir oran olabileceğini

ortaya koymuş ve 1986 yılından itibaren bu ilaç ruhsatlandırılarak kullanıma sokulmuştur (Leblebicioğlu 2008, Topçu 2008).

Karbapenemler çok geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye ve klinikte gözlenen birçok beta-laktamaza karşı stabiliteye sahiptir. Çok geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır infeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler içindedir (Bonfiglio 2002).

İnfeksiyonların tedavisinde karbapenemlerin iki önemli özelliği vardır: Geniş etki spektrumları ile birlikte AmpC ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimlerine karşı dirençli olmalarıdır. Bu son özellikleri karbapenemleri geniş spektrumlu sefalosporinlerin önüne çıkarmıştır. Bu antibiyotik grubu ayrıca bakteri hücrelerine gösterdiği penetrasyon özelliği, Gram-pozitif ve Gram-negatif ve aerob ve anaerob bakterilere etkinliği ile özellikle klinikte mikst infeksiyonların tedavisinde büyük üstünlükler sağlamıştır. Bu nedenle karbapenemler özellikle diğer birçok antibiyotiklere dirençli Gram-negatif bakteri infeksiyonları başta olmak üzere ciddi tedavi gerektiren infeksiyonlarda öncelikli bir yere sahip olmuştur. Karbapenemler içinde üç yeni üye daha ruhsatlandırılarak klinik kullanıma girmiştir. Bunlar; ertapenem (İnvanz), doripenem (Finibax) ve faropenemdir. Bu yeni antibiyotiklerden ertapenem günde tek doz kullanım kolaylığı ile klinik kullanımlarda yerini almıştır (Leblebicioğlu 2008).

Karbapenemlerde başlıca üç temel kuşağın varlığından söz edilebilir ( Tablo 2.2).

**Grup 1 karbapenemler:** Etki spektrumları daha dar ve nonfermantatif basillere etkileri sınırlı, toplum kökenli infeksiyonlarda kullanılabilenler karbapenemlerdir (ertapenem gibi).

**Grup 2 karbapenemler:** Etki spektrumları daha geniş ve nonfermantatif basillere de etkili olan, daha çok nazokomiyal infeksiyonlarda kullanılabilenler karbapenemlerdir. IMP ve meropenem (MEM) gibi.

**Grup 3 karbapenemler:** Üçüncü grup karbapenem olan CS-023 ise ikinci grubun etkinliğine ek olarak metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* ( MRSA)'a karşı da aktivite göstermektedir. Günümüzde bu kuşakta lisanslı bir ürün yoktur (Leblebicioğlu 2008, Bassetti 2009).

**Tablo 2.2.** Karbapenemlerin aktivitelere göre sınıflandırılması

Grup 1	Grup 2	Grup 3
Ertapenem Pamipenem Non fermentatif etkinlik sınırlı	Imipenem Meropenem Biapenem Doripenem	CS-023

### **Karbapenemlerin yapısı**

Temel yapı, penisilin laktam halkasına benzemektedir. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak  $\alpha$ -halkasındaki sülfür atomunda metilen vardır. Bu yapı bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmayı artırır. Bunun sonucunda etki spektrumu genişler ve antibakteriyel gücü artar. Molekül ağırlığı düşüktür, bakteri hücre membranından girişi kolay olur. Beta laktam halkasında bulunan hidroksimetil yan zinciri beta laktamazlara dayanıklılığı sağlar. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise molekülün *P. aeruginosa*'ya etkinliğini sağlamaktadır (Mandell 2000, Topçu 2008).

MEM'de IMP'den farklı olarak DHP-1 enzime dirençli olmasını sağlayan C1 atomuna bağlanmış olan metil grubu vardır (Leblebicioğlu 2008).

### **Karbapenemlerin antimikrobiyal aktivitesi**

Kullanımda olan beta-laktam antibiyotikler arasında etki spektrumu en geniş olan antibiyotik sınıfıdır. Gram pozitif ve Gram negatif, aerop ve anaeroplara etkilidirler (Topçu 2008). "Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)" duyarlılık sınırını genel olarak minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK):  $\leq 2$  mg/L olarak belirtmiştir. MİK  $> 2$  ile  $< 8$  mg/L ise orta duyarlılık sınırlarıdır (Tablo 2.3).

**Tablo 2.3.** İmipenem ve meropenemin *Pseudomonas aeruginosa* için MİK değerleri (CLSI 2013)

Karbapenemler	Disk içeriği	Zon çapı yorumlama kriteri (mm)			MIC yorumlama kriteri (µg/ml)		
		Duyarlı (S)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)	Duyarlı (S)	Orta duyarlı (I)	Dirençli (R)
İmipenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8
Meropenem	10 µg	≥19	16-18	≤15	≤2	4	≥8

Karbapenemlere geniş spektrumlu denmesinin en önemli nedenlerinden biri Gram-pozitiflere de etkili olmasıdır. MRSA hariç tüm stafilokoklar üzerine etkilidirler. Keza *Enterococcus faecium* kökenleri genellikle karbapenemlere dirençli iken, *E. faecium* dışındaki diğer enterokoklar orta duyarlı ya da duyarlıdır. Karbapenemlerin en büyük avantajlarından biri de anaeroplara karşı etkinlikleridir. Bu etkinlik birçok anaerop türü için metronidazol ve klindamisin gibi klasik anaerob etkili antibiyotiklerden daha fazladır. Bu özellikleri mikst bakteriyel infeksiyonlarda karbapenemlere büyük avantaj sağlar. (Leblebicioğlu 2008).

## 2.2. Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklerin bulunması ve kullanıma sokulmaları XX. yüzyılda tıp alanındaki en önemli buluşlardan biridir; buna karşın bu ilaçların yaygın kullanımları sonucu, çok kısa bir sürede bunlara karşı dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Tablo 2.4) (Leblebicioğlu 2008).

A. Fleming'in 1928'de penisilin'in keşfi ile başlayan antibiyotik çağı, G. Domagk'ın sülfonamid grubundan prontosilini (1932), S.A.Waksman'ın 1943'de streptomisini bulması ve tetrasiklin ve kloromfenikol'ün 1940'lı yıllarda kullanıma girmesi ile çok kısa sürede birçok antibiyotığın modern tıbbın kullanımına girmesi sürmüştür (Goozner 2004, Lawrence 2005). Ancak ilk kullanıma girdikleri yıllarda bile bu antibiyotiklerden çoğuna karşı bazı bakteriler arasında direncin görülmesi antibiyotiklerden uzun süreli faydalanmanın mümkün olmayacağına işaret olarak kabul edilmiştir (Garner 1988).

Bakterilerin antimikrobik maddelere karşı gösterdiği direnç mekanizmaları üç grup altında toplanabilir:

1- İlacın hedefinde değişiklik oluşması

a ) Reseptörün afinitesinde azalma olması

b ) İlaçtan etkilenmeyen farklı bir metabolik yolun kullanılması

2- Sentezlenen enzimle ilacın inaktive edilmesi

3- Hücreye giren ilaç miktarının azalması

a ) Permeabilitenin azalması

b ) Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması

Bir bakteri, bu mekanizmalardan bir veya birkaçını kullanarak, farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotiklere karşı direnç kazanabilmektedir (Gülay 1999, Yüce 2001).

**Tablo 2.4.** Çeşitli antibiyotiklerin klinik kullanıma girdikleri ve direncin bildirildiği tarihler (Leblebicioğlu 2008)

Antibiyotik	FDA onay tarihi	Direnç bildirim tarihi	Direnç mekanizması
Penisilin G	1943	1940	Penisilinaz
Streptomisin	1947	1947	Ribozomal protein S12' de mutasyon
Tetrasiklin	1952	1952	Atım pompası
Penisilin ve tetrasiklin ( <i>Neisseria gonorrhoeae</i> ve <i>Enterobacteriaceae</i> )	1943 ve 1952	1976-1980	Plazmid kontrolünde geniş spektrumlu beta-laktamazlar ve tetrasiklin atım pompası
Metisilin ( <i>Staphylococcus aureus</i> için tüm beta laktamlar)	1960	1961	MecA (penisilin bağlayan protein 2a)
Nalidiksik asit	1964	1966	Topoizomeraz mutasyonları
Gentamisin	1967	1969	Aminoglikozid değiştirici enzimler
Sefotaksim	1981	1981	AmpC beta-laktamazlar
		1983	Geniş spektrumlu beta laktamazlar

### 2.2.1. Beta laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan sentezinde görevli transpeptidaz ve karboksipeptidaz enzimlerini diğer adıyla PBP'leri inhibe ederek etki gösterirler (Essack 2001). Beta-laktam antibiyotik tarafından PBP'leri inhibe edilen bakteride peptidoglikan sentezlenemeyeceğinden hücre duvar yapısı bozulmaktadır. Bu durum bakterinin ozmotik direnç kaybına ve ölümüne neden olmaktadır. Bakterilerde beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç üç yolla gelişmektedir (Gülay 1999).



### **a- PBP'lerde Oluşan Değişiklikler İle Gelişen Direnç**

PBP'ler, beta laktam antibiyotiklerin hücredeki hedefleridir. PBP'lerdeki değişiklikler kromozomal mutasyonlar sonucu PBP' nin beta-laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta-laktam antibiyotiklere düşük afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi sonucu oluşabilmektedir (Forbes 2002, Leblebicioğlu 2008).

### **b-Antibiyotiklerin Hücre içine Girişinin Kısıtlanması ve Aktif Pompa Sistemleri**

Birçok beta-laktam antibiyotik, Gram-negatif bakterilerin içerisine dış membran proteinlerinden oluşan porlar yoluyla geçmektedir. Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin çeşitli özellikleri (elektriksel yük, çözünürlük, moleküler büyüklük vb), beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine giriş hızını belirlemektedir. Özellikle *P.aeruginosa*'da geçirgenliğin azalmasının yanı sıra aktif pompa sistemleri de antibiyotik direncinde etkilidir. Son yıllarda hastane infeksiyonu etkeni olarak önem kazanan *Pseudomonas*, *E.coli* ve *Acinetobacter* suslarında çoklu antibiyotik direncinden sorumlu olan aktif pompalar antibiyotik, antiseptik ve dezenfektanlar gibi yapısal olarak birbiri ile ilişkisiz bileşikler de tanıyarak hücreden atabilen membran transport proteinleridir (Forbes 2002, Gür 2004, Leblebicioğlu 2008).

Beta-laktam antibiyotikler dış membrandan porin F ve porin C adı verilen başlıca 2 kanal aracılığı ile geçerler. İmipenem dış membrandan ayrıca D2 proteini adı verilen özel bir porini kullanarak da geçer. Dolayısıyla bir Gram negatif bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta-laktamlara direnç geliştirebilirken, IMP'e duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *P.aeruginosa* ve *Enterobacter* suslarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi IMP'e dirençli hale getirebilir (Bradford 2001).

### **c- Beta Laktamazlar**

Beta-laktamazlar, beta-laktam halkasındaki siklik amid bağımlı parçalama özellikleriyle beta-laktam grubu antibiyotiklerin etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir (Rice 2003).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençte en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir (Cornaglia 2000). Günümüze kadar yaklaşık 400 civarında beta-laktamaz enzimi tanımlanmış ve beta laktamazların sayı ve çeşitlerindeki artış bu enzimlerin gruplandırılmasını zorunlu kılmıştır. 1973 yılında Richmand ve Sykes tarafından beta-laktamazlar sınıflandırılmış bu sınıflandırma 1976 yılında ise Sykes ve Matthew tarafından genişletilmiştir. Bundan sonra her yeni beta laktam grubu antibiyotik kullanılmasıyla bu tabloya yeni beta-laktamazlar eklenmiştir (Patricia 2001, Helfand 2005).

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en çok **Bush-Jacoby-Medeiros** ve **Ambler** sınıflandırmaları kullanılmaktadır. 1980 yılında beta laktamazlar Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır.

#### **Ambler sınıflandırması**

**Sınıf A:** Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, penisilinleri hidroliz eden beta-laktamazlardır.

**Sınıf B:** Aktivite gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo beta-laktamazlardır.

**Sınıf C:** Kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan öncelikle sefalosporinazlardan oluşan enzimlerdir.

**Sınıf D:** Oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazlardır (Bush 1995, Bush 2010). D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup oksasilini hızla hidrolize edebilme yeteneğindedirler. Oksasilini hidrolize edebilen (OXA) beta-laktamazlara daha çok *Enterobacteriaceae* üyelerinde ve *P. aeruginosa*'da rastlanmaktadır. OXA enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline direnç oluşturur, klavulanik asit ile inhibe olmazlar. Plazmid veya integron gibi hareketli genetik yapılar üzerinde bulunmaları bakteriler arasında aktarıma katkıda bulunur (Rice 2003). Bazı OXA tipi enzimler ( OXA-2, OXA-10-11, OXA-14-17, OXA-19, OXA-28, OXA-32, OXA-35) GSBL karakterindedir. OXA tipi GSBL'ler özellikle *P. aeruginosa*'da bulunur (Brown 2005).

Moleküler sınıf D'de bulunan karbapenemleri hidrolize eden enzimler özellikle *A. baumannii* izolatlarında görülmektedir (Gülay 2003, Walther-Rasmussen 2006,Sevillano 2009, Sarı 2013)

Bugün için en geçerli kabul edilen beta laktamaz sınıflandırması 1995 yılında Bush ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Enzimlerin substrat ve inhibitör profilleri gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri dikkate alınarak yapılan Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması 4 ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşmaktadır. Fonksiyonel sınıflama daha subjektif kabul edilmekle birlikte klinikte direnç profilinin enzim özellikleri (hidrolitik / inhibitör) ile ilişkilendirilmesine yardım eder. 1995 yılında Bush ve ark.'ları tarafından yapılan sınıflama, en son 2010 yılında güncellenmiştir (Bush 2010). Beta-laktamazların yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre güncel sınıflandırması Tablo 2.5'te yer almaktadır.

**Tablo 2.5: Beta Laktamazların Sınıflandırılması (Bush 2010)**

Bush-Jacoby (2009)	Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Moleküler sınıflama	Ayrılcı substratlar	İnhibisyon		Belirleyici özellikler	Grubu temsil eden enzimler
				CA veya TB	EDTA		
1	1	C	Sefalosporinler	Hayır	Hayır	Benzilpenisilinlerden sefalosporinlerin daha iyi hidroliz olması; sefamizinin hidrolizi	E.coli Amp C, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Sefalosporinler	Hayır	Hayır	Seftazidimin ve çoğu kez diğer oksimino $\beta$ laktamların artmış hidrolizi	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penisilinler	Evet	Hayır	Benzilpenisilinlerin sefalosporinlerden daha iyi hidroliz olması	PC1
2b	2b	A	Penisilinler, ilk Sefalosporinler	Evet	Hayır	Benzilpenisilin ve sefalosporinlerin eş hidrolizi	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Evet	Hayır	Oksimino $\beta$ laktamların (sefotaksim, seftazidim, sefepim, aztreonam) artmış hidrolizi	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penisilinler	Hayır	Hayır	Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktama direnç	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler, monobaktamlar	Hayır	Hayır	Oksimino $\beta$ laktamların artmış hidrolizi ile klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktama direncin kombinasyonu	TEM-50
2c	2c	A	Karbenisilin	Evet	Hayır	Karbenisiline artmış hidroliz	PS1, CARB-3
2ce	NI	A	Karbenisilin, sefepim	Evet	Hayır	Karbenisiline, sefepime artmış hidroliz	RTG-4
2d	2d	D	Kloksasilin	Değişken	Hayır	Kloksasiline veya oksasiline artmış hidroliz	OXA-1, OXA-10
2de	NI	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Değişken	Hayır	Kloksasilin veya oksasilin ve oksimino $\beta$ laktamların hidrolizi	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Karbapenemler	Değişken	Hayır	Kloksasilin veya oksasilin ve karbapenemlerin hidrolizi	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Evet	Hayır	Sefalosporinlerin hidrolizi. klavulanik asit ile inhibisyon ama aztreonam ile değil.	CepA
2f	2f	A	Karbapenemler	Değişken	Hayır	Oksimino $\beta$ laktamların, sefamizinin, karbapenemlerin artmış hidrolizi	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1) B(B3)	Karbapenemler	Hayır	Evet	Monobaktamları içermeyen karbapenemleri içeren genişlemiş spektrumlu hidroliz	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B(B2)	Karbapenemler	Hayır	Evet	Karbapenemlerin öncelikli hidrolizi	CphA, Sfh-1
NI	4	Bilinmiyor					

NI: Not included (içermez) , CA: klavulanik asit, TZB: tazobaktam

## **Bush-Jacoby sınıflandırması**

**Grup 1 sefalosporinazlar:** Pek çok enterik bakterinin kromozomlarında kodlanan, moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır. Klavulanik asit ile inhibisyona genellikle dirençlidirler; benzilpenisilinden daha çok sefalosporinlere ve sefamisinlere etkilidirler. *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae* ve *P. aeruginosa* dahil pek çok bakteride indüklenebilir özellikte, düşük düzeyde AmpC ekspresyonu bulunur. Büyük miktarlarda üretildiklerinde, karbapenemlere direnç gelişmesine neden olurlar. CMY, ACT, DHA, FOX, MIR gibi plazmid aracılı grup 1 enzimler 1989'dan beri bilinmekle birlikte grup 2be GSBL'lerden daha az sıklıkta bulunurlar. Yeni alt grup 1e diğer oksimino-beta-laktamlara göre seftazidime daha etkilidir, genişlemiş spektrumlu AmpC (ESAC) diye adlandırılırlar; Yakın zamanda *P. aeruginosa*'da IMP'e karşı artmış aktivite gösteren bir AmpC varyantı tanımlanmıştır (Rodriguez-Martinez 2009).

**Grup 2 serin beta-laktamazlar:** GSBL'lerin son 20 yılda artan identifikasyonuna bağlı olarak tanımlanan en geniş beta-laktamaz grubudur. Moleküler sınıf A ve D'yi kapsar, grup 2d'deki oksasilinazlar dışında tamamı moleküler sınıf A'da yer alır.

**Grup 2a:** Bu gruptaki enzimler penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidrolize eder. Stafilokoklar gibi Gram pozitif bakterilerdeki baskın beta-laktamazlardır. Bazı stafilokokkal penisilinazlar plazmidde kodlanmış olsa da bu enzimlerin çoğu kromozomaldır.

**Grup 2b:** Penisilin ve 1. kuşak sefalosporinleri hidrolize eden, klavulanik asit ve tazobaktamla inhibe olan enzimlerdir. Plazmid kontrolünde olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır; 1995'ten beri bu grupta en az 9 TEM, 29 SHV enzimi tanımlanmıştır.

**Grup 2be:** GSBL'leri içeren gruptur. Grup 2b'nin etki spektrumuna ek olarak sefotaksim, seftazidim gibi bir ya da daha fazla oksimino-beta-laktamı da hidrolize ederler. Klavulanik asitle inhibisyona duyarlıdır. Grup 2be'nin ilk ve en büyük alt grubu, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinden türemiştir. BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 ve PER ve VEB enzim aileleri gibi daha nadir olan GSBL'ler de vardır.

**Grup 2br:** Klavulanik asit ve ilgili inhibitörlere dirençli, grup 2b etki spektrumuna sahip enzimlerdir. TEM-30, TEM-31 ve SHV-10 bu gruptadır.

**Grup 2ber:** Klavulanik asit inhibisyonuna daha dirençli TEM enzimlerini içerir. Bazılarında klavulanik asit direnci düşük düzeydedir; bunlara kompleks mutant TEM (CMT) beta-laktamazlar da denir [Örn: TEM-50 (CMT-1)] (Poirel 2006, Bush 2010).

**Grup 2c:** Karbenisilini hidrolize eden ve klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olan enzimleri içerir. PSE-1, PSE-3, PSE-4 enzimleri, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve 2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1 enzimi bu gruptadır (Bush 1995).

**Grup 2ce:** Yakın zamanda tanımlanan sefepim ve sefpiroma karşı etkili genişlemiş spektrumlu karbenisilnaz RTG-4 (CARB-10)'ü içerir.

**Grup 2e:** Klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olan ve genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize edebilen sefalosporinazlardır. Direnç profillerinin benzerliği ve benzer mikroorganizmalarda bulunmaları nedeniyle bu gruptaki enzimler, grup 1 AmpC enzimleri ya da GSBL'ler ile karıştırılabilir. AmpC enzimlerinden aztreonama olan düşük afiniteleriyle ayrılabilirler.

**Grup 2f:** Moleküler sınıf A'daki serin karbapenamazlardır. IMI-1 ve NMC-1'in yanı sıra SME ailesi, kromozomal grup 2f enzimlerindedir. Bu grupta plazmidde kodlanan KPC ve bazı GES (eski adıyla IBC) enzimleri önem taşır. Özellikle KPC karbapenamazlar, hastanelerdeki çoklu ilaç dirençli Gram negatif infeksiyonları ile ilişkilendirilmiştir.

**Grup 2d:** Bu grupta oksasilini ya da kloksasilini benzilpenisilinden daha hızlı hidrolize edebilen OXA enzimleri yer almaktadır. OXA enzimleri beta-laktamazların ikinci büyük ailesini oluşturur. OXA ailesi üyelerinin çoğu fonksiyonlarından ziyade korunmuş aminoasit motiflerine göre tanımlanır. Bu gruptaki enzimler çoğunlukla NaCl tarafından inhibe edilir.

**Grup 2de:** Karbapenemler hariç genişlemiş spektrumlu oksimino beta-laktamları, oksasilini ya da kloksasilini hidrolize eden enzimleri içerir. Çoğu OXA-10'dan köken alır, OXA-10 ve OXA-15 gibi enzimler bu grupta yer alır. Çoğunlukla Türkiye ve Fransa'da izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında bulunur. Seftazidim direnci genellikle sefotaksim direncinden daha çok göze çarpar (Poirel 2006, Bush 2010)

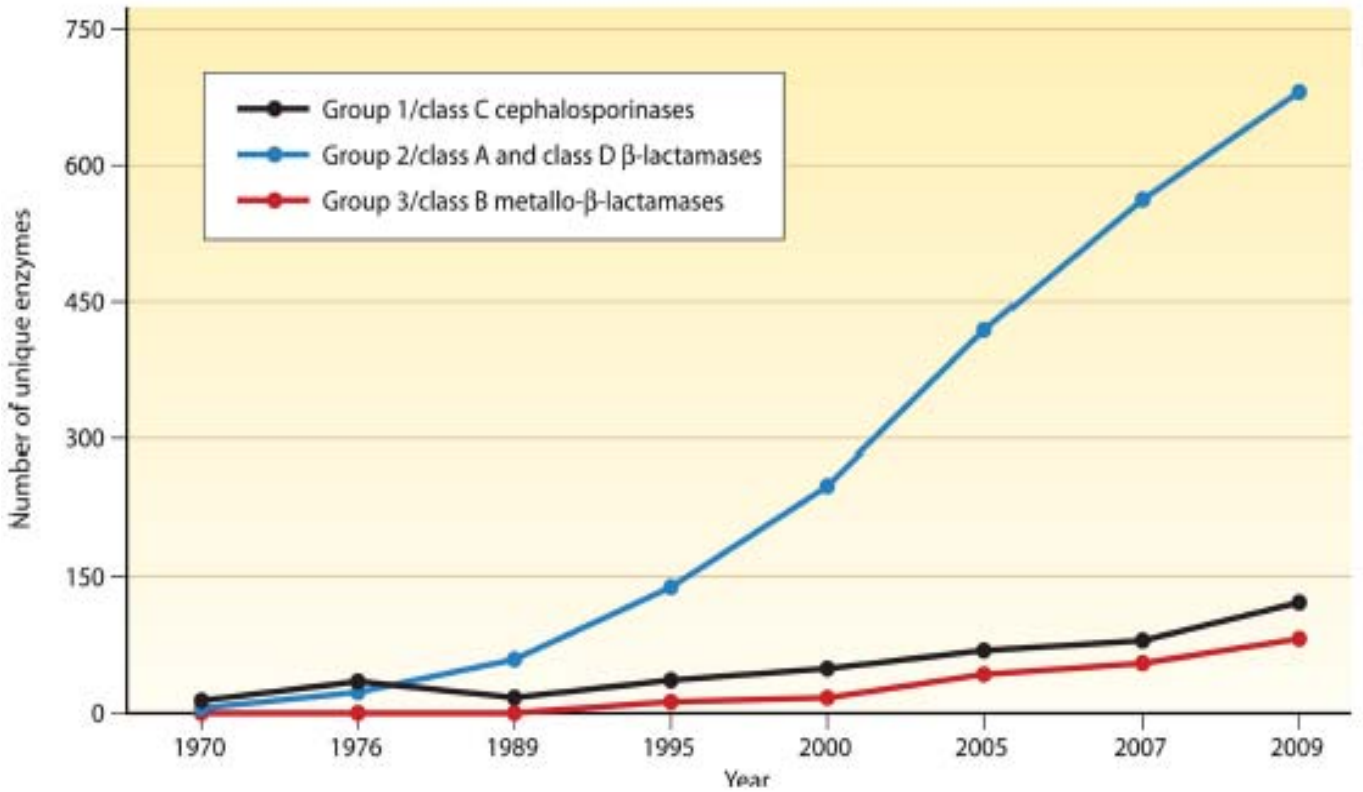
**Grup 2df:** Karbapenemleri hidrolize edebilen OXA enzimleridir. En sık *A. baumannii*'de bulunurlar ve her ne kadar *Enterobacteriaceae*'da plazmid kaynaklı OXA-23 ve OXA-48 enzimleri de tanımlanmış olsa da genellikle kromozomal genler tarafından üretilirler. 2df enzimleri amino asit homolojilerine göre dokuz gruba ayrılırlar (Tablo 2.6) Alt grup 2df'de 2d grubunun özelliği daha baskındır; oksasilini karbapenemlerden 40-50 kat daha hızlı hidrolize ederler ancak OXA-50'nin oksasilin hidrolizi saptanmamıştır. Bu gruptaki enzimler klavulanik asitle inhibe olmazlar (Bush 2010, Sarı 2013).

**Grup 3 MBL'lar:** Yapısal ve fonksiyonel olarak özgün bir beta-laktamaz grubudur. Yapısal olarak aktif bölgelerinde çinko iyonuna gerek duyarlar, fonksiyonel olarak ise karbapenemleri hidrolize edebilirler. Bu özellikleri ile diğer beta-laktamazlardan ayrılırlar. Ancak bazı serin beta-laktamazlar da karbapenemleri hidrolize edebilme özelliğine sahiptirler. Serin beta-laktamazların aksine MBL'ların monobaktamlara afinitesi düşüktür ve klavulanik asit ya da tazobaktam ile inhibe olmazlar. Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA), dipikolinik asit ya da

1,10-*o*-fenantrolin gibi metal iyon şelatörleri tarafından inhibe edilirler (Bush 2010, Demirdağ 2011). Farklı MBL'ların diğer beta-laktamlara etkinlikleri ve substrat özgüllükleri değişkendir. Karbapenemaz aktiviteleri ve inhibitörlere direnç, MBL'ların klinik kullanımda endişe veren özellikleridir (Cornaglia 2011).

**Grup 4 beta-laktamazlar:** Bu enzimler henüz kesin olarak tanımlanmamış olup; 1995 fonksiyonel sınıflamasında yer almakla birlikte 2009 sınıflamasına dahil edilmemişlerdir. Bilgilerimiz arttıkça muhtemelen mevcut enzim gruplarından birine dahil edileceklerdir (Bush 2010).

**Şekil 2.3:** Beta laktamazların yıllara göre sayılarındaki artış (Bush 2010)



### **2.2.1.1 Karbapenemlere direnç mekanizmaları**

Karbapenemler, çoklu dirençli Gram negatif bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılan antibiyotik grubudur. Ancak, karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bunlara karşı direnç oranlarının artmasıyla sonlanmıştır.

Karbapenemlere karşı bilinen 3 etki mekanizması ile direnç gelişebilmektedir:

#### **1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması**

##### **a. Porin değişimleri**

Bu özellikle *P.aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır. *P.aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle IMP tedavisi sırasında gelişmektedir (Rasmussen 1997).

##### **b. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi**

#### **2.Hedef PBP değişimleri**

Tek başına nadir görülür ancak diğer mekanizmalar ile birlikte.

#### **3. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı (karbapenemazlar)**

En geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından IMP veya MEM'den birini, belirgin olarak hidrolize eden beta-laktamazlar olarak tanımlanabilir. Bu enzimlerin çoğu yalnız karbapenemlere değil, diğer beta-laktam ajanlara da etkilidirler (Rasmussen 1997, Bonfiglio 2002).

#### **Doğal olarak bulunan Karbapenemazlar**

Yapısal olarak bulunan karbapenemazlar 1980 yıllarının başlarında nonfermantatif bakteriler ve *Aeromonas* türlerinde saptanmıştır. Bu grup karbapenemazlar aktif bölgelerinde çinko içermeleri nedeniyle moleküler sınıf B'de yer alırlar, klinik önemleri henüz açık değildir (Poirel 2004).

#### **Kazanılmış Karbapenemazlar**

Bu enzimler sadece karbapenem direncinden değil, aynı zamanda beta laktam antimikrobiyallerin direncinden de sorumludur (Poirel 2004).

İlk belirlenen karbapenemazlar EDTA (Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid) tarafından inhibe oldukları için metalloenzimler olarak adlandırılmıştır. Ancak 1980'li yılların sonunda karbapenemleri hidrolize eden, EDTA ile inhibe olmayan enzimler saptanmıştır (Queenan 2007). Karbapenemazların sayısı ve çeşitliliğindeki bu artışla sınıflandırılma ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Beta laktamazlar fonksiyonel ve moleküler olarak sınıflandırılmıştır.

Fonksiyonel sınıflamada karbapenemazlar grup 2d, 2f ve 3 içerisinde, moleküler sınıflamada ise sınıf A, B ve D içerisinde yer almaktadır (Bush 2010)

Sınıf A karbapenemazlar, tüm beta laktamları hidrolize eder. Sefoksitin ve seftazidim için zayıf, fakat belirlenebilir bir hidroliz sözkonusudur. GSBL'ler ile karıştırılabilir. Her iki grupta geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eder. Farklı karbapenem hidroliz aktivitesi ve bu aktivitenin klavulanik asit ve tazobaktam tarafından sadece zayıf inhibisyon göstermesidir (Yiğit 2001, Nordmann 2009).

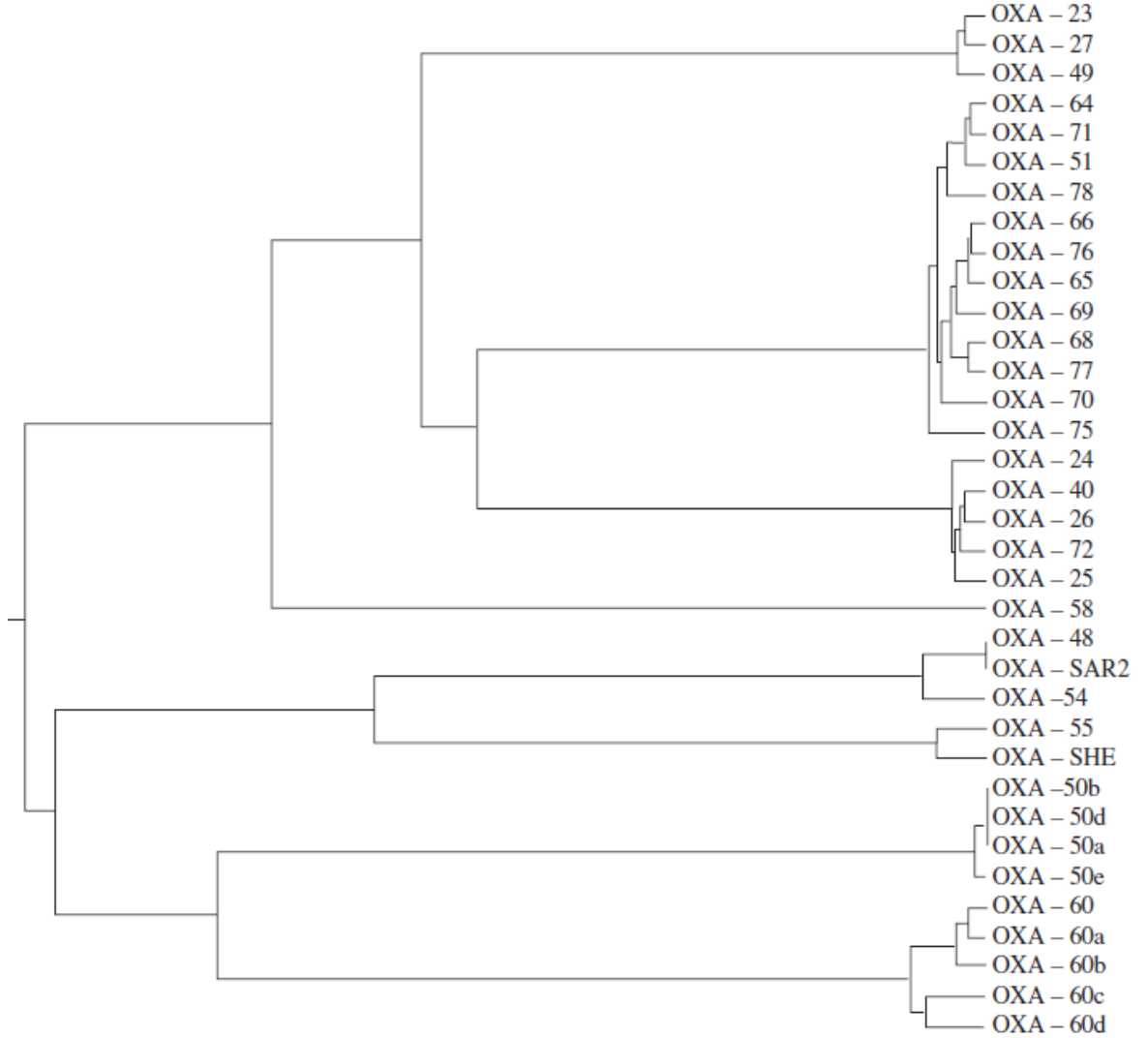
Sınıf B metallobeta-laktamazların hidroliz mekanizması ise, enzimin aktif bölgesindeki çinko iyonu ile beta-laktamların etkileşmesi üzerinedir. Dolayısıyla, bunlar çinko bağlayıcı olan EDTA ve diğer divalent katyonlarla inhibe olur. Klavulanik asit ve tazobaktam tarafından inhibe edilmez (Queenan 2007, Poirel 2007). Karbapenem hidroliz aktiviteleri diğer grup karbapenemazlara göre daha fazla ve karbapenemler için oluşturdukları minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri daha yüksektir.

Sınıf D karbapenemazlar, bu grupta oksasilinleri hidrolize eden, ismini de burdan alan OXA grubu enzimler vardır (Brown 2005). OXA grubu enzimler, Ambler grup D'de fonksiyonel grup 2d'de yer alan ve daha çok *P. aeruginosa*'da bulunan enzimlerdir. OXA grubu enzimler, aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oluşan oksiminosefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimlerdir. OXA beta-laktamaz ailesi genotipik özellikleri ortak olmasından çok fenotipik özellikleri birbirine benzeyen beta-laktamazlar tarafından oluşturulmuş bir gruptur. OXA enzimleri için oksasilin ve kloksasilin temel substratlardır. Ayrıca sefalotin gibi dar spektrumlu sefalosporinleri ve ampisilini de hidroliz edebilirler (Gür1997; Bradford 2001, Walther-Rasmussen 2006).

Bu enzimlerden OXA-1' den OXA-10' a kadar olanları dar spektrumlu enzimlerdir. Oksasilin ve kloksasilini substrat olarak tercih ederler. Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Hacettepe Üniversitesi Hastanesi'nde yatan bir hastadan izole edilen bir *Pseudomonas* suşunda bulunmuştur. Bu grupta 30'dan fazla OXA enzimi tespit edilmiştir. OXA-11, 14, 15, 16 seftazidim direncine yol açarken, OXA-17 sefotaksime direnç oluşturmaktadır. OXA-31 sefepime dirençli olması seftazidime duyarlı olması ile dikkatleri üzerine çekmiştir. Son olarak OXA-20, OXA-23, OXA-24, OXA-40 gibi yeni tanımlanan bazı enzimler karbapenemaz aktivitesi gösterir iken GSBL değildirler (Pechere 1999, Toleman 2003).



Şekil 2.4: OXA karbapenemazların dendrogramı (Walther-Rasmussen 2006)



Karbapenemleri hidrolize eden OXA enzimleri Şekil 2.4'daki dendrogramda gösterildiği gibi sekiz farklı dala ya da subgruba ayrılır. Bu sekiz gruptan dördü *A. baumannii*' de tanımlanmıştır. İlk grup ARI-1 olarak da isimlendirilen OXA-23 ve OXA-27, OXA-49 enzimlerinden oluşur. İkinci grupta OXA-24, -25, -26, -40, -72 bulunmaktadır. Üçüncü grup OXA-51 enzimini içerir. Yakın zamanda tanımlanmış OXA-51 ailesi OXA tipi karbapenemazların yeni bir filumunu oluşturur. Dördüncü grupta ise OXA-58 enzimi bulunmaktadır (Walther-Rasmussen 2006).

#### **Karbapenem Hidrolize Eden Oksasilinazlar ( KHO'lar)**

Günümüzde 120'den fazla D grubu beta-laktamaz tanımlanmış olup bunlardan 45 kadarı KHO aktivitesi gösterirler. KHO'lar yeni sınıflandırmada grup 2df'de yer alırlar (Bush

2010). Çoğunlukla *Acinetobacter* türlerinde, daha az sıklıkla da enterik Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır. Ancak, ülkemizde özellikle OXA-48 aracılığıyla enterobakterilerde oluşan karbapenem direnci son yıllarda artan oranda bildirilmektedir (Walther-Rasmussen 2006, Aktaş 2008, Walsh 2010).

Bu enzimler oksasilini klasik penisilinlerden daha hızlı hidrolize etmeleri nedeniyle oksasilinazlar olarak tanımlanmıştır. Klavulanik asit ve EDTA ile zayıf bir inhibisyon gösterir. Genel olarak oksasilinazlar, seftazidim, sefotaksim ve aztreonamı ya hiç hidrolize etmez ya da zayıf bir şekilde hidrolize eder (Walther-Rasmussen 2006, Aktaş 2008). OXA tip karbapenemazların çoğu IMP ve özellikle MEM'e karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterir. Karbapenemlere karşı aktivite gösteren sınıf D oksasilinazlar, MBL sınıfı ile karşılaştırıldığında bu enzimlerin karbapenemlere karşı hidrolitik etkinliğinin oldukça düşük olduğu vurgulanmıştır (Woodford 2006).

KHO'ları, OXA-23-27-49 (grup 1), OXA 24-25-26-40-72 (grup 2), OXA-58 (grup 3), OXA-51 (grup 4) olarak gruplandırabiliriz (Vahapoğlu 2006, Walther-Rasmussen 2006, Miriagou 2010). Son yayınlarda ise KHO'lar klonal yakınlıklarına göre altı grupta incelenmiştir (Poirel 2010, Higgins 2013)

- **Grup 1:** OXA-23, OXA-27, OXA-49
- **Grup 2:** OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA-40, OXA-72
- **Grup 3:** OXA-58
- **Grup 4:** OXA-51
- **Grup 5:** OXA-143
- **Grup 6:** OXA-235

Karbapenemleri hidrolize eden bu OXA enzimleri *A. baumannii* tipine spesifik olarak bilinmekte ve bu enzimler *A. baumannii*'de karbapenem direncinin en yaygın nedeni olarak kabul edilmektedir (Sarı 2013). Bu çalışmada *A. baumannii*'de karbapenem direncine yol açan bu enzimlerin, karbapenem dirençli *Pseudomonas*'larda varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Kazanılmış KHO ilk olarak 1985'te İskoçyada Edinburg Üniversitesinde izole edilen bir *Acinetobacter* suşunda gösterilmiştir. . İskoçya'da bu enzim *A.baumannii*'de plazmitden identifiye edilmiş ve ARI-1 olarak isimlendirilmiştir. Enzimin genetik ve biyokimyasal incelenmesini takiben OXA-23 olarak adlandırılmıştır (Paton 1993). OXA-23,

*A.baumannii*'de doğal olarak bulunan OXA-51 benzeri enzimlerle % 56 amino asit benzerliğine sahip olup, KHO'ların ilk temsilcisidir (Brown 2006). OXA-23'ün OXA 27 ve OXA 49 olarak subgrupları bulunmaktadır. OXA-23'den sonra Singapur'dan OXA-27 bildirilmiştir (Afzal-Shah 2001). Çin'de *A.baumannii*'de OXA 49 identifiye edilmiştir (Poirel 2006).

Kazanılmış ikinci küme KHO'lar OXA-24, OXA-25, OXA-26 ve OXA-40'ı içerir. Bu enzimler OXA-23 ile % 60 ve OXA-51 enzimleri ile % 62 oranında amino asit benzerliği göstermiştir (Çiftci 2011). Bu kümedeki enzimlerin pek çoğu birbirinin yakın varyantı gibi görünmektedir. OXA-26 ilk başta Belçika'daki bir izolatta gösterilmiştir (Afzal-Shah 2001). OXA-40'ın İspanya ve Portekiz'deki *A.baumannii* izolatlarında yaygın olduğu bildirilmiştir (Da Silva 2004). İspanyada karbapenem dirençli *A.baumannii*'de OXA-24 ve OXA-25 varyantları bildirilmiştir (Poirel 2006).

Kazanılmış KHO üçüncü potansiyel kümesi ilk olarak Fransa'da saptanan OXA-58'dir. OXA-58, OXA-51 doğal enzim kümesi ile % 59 benzerliğine sahiptir (Çiftci 2011). OXA-58 tipi Türkiye, İspanya, Romanya, Kuveyt, İtalya, Arjantin, Avusturya, İngiltere gibi çeşitli coğrafik bölgelerde yayılım göstermektedir (Poirel 2006). OXA-58'in *A.baumannii*'de eksprese olduğunda karbapenemlere duyarlılığı azaltıp, aşırı ekspresyon durumunda da yüksek karbapenem direncine yol açtığı bildirilmiştir (Çiftci 2011). OXA-58 *A.junii*'de bulunan OXA-58 ve IMP-4 beta laktamazları birlikte karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. OXA-23 ve OXA-58 genleri genellikle plazmiden izole edilmektedir, OXA-40 ise kromozomda lokalize olmaktadır. Ancak bugüne kadar *Acinetobacter*'de tanımlanan KHO'ların kromozomal olarak kodlandığı gözlenmiştir. *P.aeruginosa*'da OXA-40 geni çoğunlukla integronla taşınmaktadır (Poirel 2006).

OXA-51 benzeri enzim kümesinin genomik kaynağı halen bilinmemektedir. Muhtemelen antibiyotik üreten toprak mikroorganizmalarına karşı direnç mekanizması olarak veya bilinmeyen organizmalardan kaynaklanıp kromozoma integre olmuştur. Kaynağı ne olursa olsun OXA-51 enzim kümesi üyeleri *A. baumannii*'nin hemen hemen tüm izolatlarında doğal yapı olmasına rağmen diğer *Acinetobacter* türlerinde bulunmaz. Bu enzimlerin sıklıkla diğer kümelere ait kazanılmış OXA tipi enzimlerle kombine olarak bulunduğu ve belirli şartlar altında karbapenem direncinde en azından sinerjik rolü olabileceği öne sürülmüştür (Çiftci 2011).

### **2.2.2 *Pseudomonas*'larda direnç mekanizmaları**

*Pseudomonas*'lar ampisilin, amoksisilin, amoksisilin/klavulanat, birinci kusak sefalosporinler, ikinci kusak sefalosporinler, sefotaksim, nalidiksik asit, trimetoprim gibi çok sayıda antibiyotiğe doğal olarak dirençlidir (Livermore 2001). Bu doğal dirençte, bakterinin dış membran geçirgenliğinin az olması ve yapısal olarak bulunan aktif pompalama sistemleri arasındaki sinerji anahtar rol oynar (Schweizer 2003).

*Pseudomonas*'larda; kromozomal ve plazmid kaynaklı beta-laktamazların üretimi, hedef ve porin proteinlerindeki değişiklik sonucu dış membran geçirgenliğinin azalması, efluks pompa sistemi ile antimikrobiyal ilacın dışarı atılması başlıca direnç mekanizmalarıdır. GSBL ve AmpC tipi beta-laktamazların yanı sıra IMP ve/veya MEM'i hidrolize edebilen karbapenemaz enzimlerine sahiptirler. Karbapenemaz enzimleri içerisinde klinik yönden en önemlileri metallo-beta-laktamaz(MBL) enzimleridir ve bu enzimlerin araştırıldığı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Karbapenemlerin tedavide yoğun olarak kullanılmasına paralel olarak son yıllarda OXA tipi karbapenemaz enzimi bildirimleri de artmaktadır. GSBL tipi OXA enzimlerinin araştırıldığı çok sayıda çalışma vardır (Bush 1995, Nordmann 2002, Strateva 2009). Karbapenem hidrolize eden karbapenemaz grubu OXA enzimlerinin *Pseudomonas*'lardaki varlığı ve sıklığına dair yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle bu tez konusu karbapenem direnci olan *Pseudomonas*'larda OXA-23, OXA-40, OXA-58 enzimlerinin araştırılması olarak belirlenmiştir. Bu sayede bölgemizde ve ülkemizde karbapenemleri hidrolize eden OXA enzim sıklığının tespiti sağlanacaktır.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmaya Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 2012/34 no'lu kararı ile onay alınarak başlandı. Çalışma Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 12151800 no'lu proje ile desteklenmiştir.

Çalışmaya Kasım 2011 – Ekim 2013 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na kültür için gönderilen klinik örneklerden izole edilen; otomatize sistem ve kalitatif bakteriyolojik yöntemler ile identifiye edilen; IMP ve/veya MEM'e dirençli olan 184 *Pseudomonas* spp. izolatı dahil edildi. Aynı hastanın tekrarlayan izolatlarının çalışmaya seçilmesinde antibiyotik direnç paterninin farklı olması veya farklı dönemlerdeki kültür numunelerinde üreyen ve infeksiyon etkeni kabul edilen *Pseudomonas* spp. olması esas alındı.

#### 3.1. Tür tayini ve Karbapenem direncinin belirlenmesi

##### 3.1.1 Kullanılan besiyerleri

###### **Kanlı Agar**

Hazır ticari olarak satılmakta olan ve 90 mm çapında, plastik petri içerisinde, % 5 koyun kanı içeren Mueller Hinton agar (Biomérieux, Fransa) kullanıldı.

###### **Eosin Metilen Blue Agar**

Toz halinde ticari olarak satılmakta olan EMB agar, bir balon içerisinde 1 litre distile suya 36 gram eklenip 12 °C'de 15 dakika otoklavlanarak hazırlandı. El yakmayacak sıcaklığa (40-50°C'ye) düştüğünde daha önceden steril etmiş olduğumuz cam petrilere (70-90 mm çapında) 4 mm kalınlıkta olacak şekilde döküldü ve besiyeri oda ısısında donduktan sonra plakları ters çevirerek buzdolabında +4 °C 'de muhafaza edildi. Ekim yapmadan önce oda ısısında bir süre beklettikten sonra ekimler yapıldı.

###### **Mueller Hinton Agar (MHA) besiyeri**

Üretici firmanın önerisine göre 38 g toz besiyeri 1 litre distile suda eritildi, 121°C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Besiyeri 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra 9 cm çapında steril plastik petri kutularına 4 mm kalınlığında döküldü.

###### **Boncuklu Saklama Besiyeri**

%10 gliserol, %10 kan içeren beyin kalp infüzyon agar (BHIB) besiyerine cam boncuklar konularak hazırlandı.

### 3.1.2 Konvansiyonel Yöntemler

#### Katalaz Testi (Gunn ve ark 1987)

- Katı besi yerinde (kanlı agar hariç) üremiş olan mikroorganizma kolonilerinden platin öze ile yeterli miktarda alınarak temiz bir lamın üzerine konuldu.
- Üzerine, % 30'luk hidrojen peroksitten bir damla damlatıldı.
- Hidrojen peroksit katılmasından sonra hava kabarcıkların görülmesi pozitif reaksiyon olarak değerlendirildi.

#### Oksidaz testi

Üreyen bakterilerin kanlı agardaki kolonileri üzerine hazır olarak temin edilen substrat emdirilmiş (tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride) strip (Oxoid), değdirilerek oluşan renk reaksiyonu 1-2 dakika içerisinde değerlendirildi. Kağıt üzerinde mavi, mor rengin oluşması oksidaz pozitif olarak değerlendirildi. Hiç bir renk değişikliğinin olmaması negatif olarak değerlendirildi (Michael ve Abbott 2002).

Laboratuvarımıza gelen kan, idrar, trakeal aspirat, balgam, bronkoalveoler lavaj, BOS, abse, boğaz, burun sürüntüsü, drenaj, periton, plevra, vaginal akıntı, üretral akıntı, yara olmak üzere çeşitli örnekler kanlı besiyeri ve Eosin Metilen Blue (EMB) besiyerlerine ekilerek 37°C etüvde 18-24 saat inkübe edildi. Bakteri tanımlanmasında kalitatif bakteriyolojik yöntemler ve otomatize sistem (VITEK 2, Biomerieux, Fransa) kullanıldı.

Kalitatif bakteriyolojik yöntem olarak; hem kanlı besiyeri hem EMB besiyerinde üreyen, EMB besiyerinde nonfermantatif olarak üreyen, katalaz testi ve oksidaz testi pozitif olan, hareketli, yapılan Gram boyamada Gram (-) basiller olarak görünen, karakteristik koloni morfolojisi ve kokusu olan, Mueller-Hinton agarda mavi-yeşil pigment yapan suşlar *Pseudomonas* olarak değerlendirildi. VITEK 2 otomatize sistem ile *Pseudomonas* olarak tanımlanamayan suşlar çalışmaya dahil edilmedi. Elde edilen saf kolonilerin antibiyotik duyarlılığı için Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanıldı. Üreyen *Pseudomonas* kolonilerinden, steril buyyon besiyeri içerisine 0.5 Mc Farland bulanıklıkta hazırlanan süspansiyon, Mueller-Hinton Agara yayıldıktan sonra besiyerinin yüzeyine IMP (10 µg) ve MEM (10 µg) antibiyotiği emdirilmiş diskleri yerleştirildi; 37 °C'de 18-24 saatlik aerobik ortamda inkübasyonu takiben, antibiyotik diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları

ölçüldü ve bakterilerin antibiyotik duyarlılıkları saptandı. Zon çapı  $\geq 19$  mm olanlar duyarlı, 16 mm-18 mm arasındakiler orta duyarlı,  $\leq 15$  mm olanlar dirençli kabul edildi (CLSI 2013). Zon çapı 15 mm'nin altında olan dirençli suşlar çalışmaya alındı. Standart suş olarak *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşu kullanıldı. Sonuçlar VITEK 2 otomatize sistem ile de doğrulandı. VITEK-2 otomatize sistemde MIK değeri  $\leq 2$  olanlar duyarlı,  $\geq 8$  olanlar dirençli, bu iki değer arasında kalanlar ise orta duyarlı kabul edildi. Tüm suşların karbapenem duyarlılıkları her iki yöntemle de uyumlu sonuçlar verdi.

VITEK-2 otomatize sistemi için özel olarak kullanılan deney tüpüne (12x75 mm) 3ml steril tamponlanmış tuzlu su (%0.45-0.50 NaCl, pH 4.5-7.0) konulmuş, saf koloniler öze ile alınıp tüpe aktarılmış ve McFarland 0,5 bulanıklığına bakteri süspansiyonları ayarlandı. İncelenen her örnek için 2 tane tüp kullanıldı. Birinci tüpe saf bakteri kolonilerinden hazırlanan süspansiyon eklendi, ikinci tüp ise boş yerleştirildi. Kasetin içerisinde bulunan birinci tüpün arka kısmına Gram negatif identifikasyon kartı (VITEK-2 GN, BioMerieux SA-Fransa) ve boş tüpün arka kısmına Gram negatif antibiyotik duyarlılık kartı kullanım talimatına uygun yerleştirildi. 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrası suşların cins ve tür düzeyinde tanımlamaları yapılmıştır, izolatlar antibiyotik duyarlılık yönünden de değerlendirildi.

Kültürde üreyen, kalitatif bakteriyolojik yöntemlerle ve VITEK 2 otomatize sistem ile *Pseudomonas* olarak tiplendirilen ve IMP ve/ veya MEM'e dirençli olan *Pseudomonas* suşlarının saf kültürlerinden -20 C°'de saklamak üzere boncuk içeren beyin kalp infüzyon agar saklama besiyerlerine alındı ve PZR çalışmasına kadar -20 C°de saklandı.

PZR çalışması öncesinde saklanan suşların boncuklu saklama besiyerinden kanlı agara tek koloni pasajları yapıldı. Tek koloni pasajları aerop koşullarda, 37°C'de, 18-24 saatlik inkübasyon sonucu elde edildi. Elde edilen tek koloniler ile PZR çalışması yapıldı.

### **3.2. OXA genlerinin multipleks PZR ile belirlenmesi**

DNA izolasyonu Hyplex Prep Modul izolasyon kiti (Amplex Diagnostics GMBH, Almanya) ile multipleks PZR amplifikasyonu ve hibridizasyon aşaması ise Hyplex CarbOxa ID (Amplex Diagnostics GMBH, Almanya) hazır ticari kiti ile çalışıldı.

Çalışma üç aşama da yapıldı:

1. Kültür plaklarından DNA ekstraksiyonu
2. Multipleks PZR amplifikasyonu
3. Hibridizasyon

## **Hyplex Prep Modul izolasyon kit içeriği**

- Buffer B1
- Reagent B2
- Buffer B5 ( konsantre)
- Buffer BW
- Hyplex prep kolonları (artı toplama tüpleri)
- 2 ml'lik toplama tüpleri
- Buffer B3 için etiket ve Hyplex lysis buffer

### **3.2.1. Kültür plaklarından DNA izolasyonu**

1. Tek koloni pasajı olarak hazırlanan pasajlardan eküvyon silgiç ile tek *Pseudomonas* kolonisi alınarak 200 µl Hyplex Lysis Buffer içerisinde çözüldü.

2. Hazırlanan örnekler 99°C'de 10 dakika ısı bloğunda bekletildi.

3. 10000 devirde 2 dakika santrifüj edildi.

4. Sonrasında dip kısmına dokunulmadan yeni tüpe aktarıldı.

5. Her bir örneğe sırasıyla 200 µl Buffer B3 ve 210 µl etanol eklendi ve iyice karıştırıldı ( Buffer B3, buffer B1 ve reagent B2 karıştırılarak elde ediliyor).

6. Tüpün içerisindeki karışımın tamamı vortekslendi sonrasında filtre spin kolonlara aktarıldı.

7. 10000 devirde 1 dakika santrifüj edildi.

8. Tüpün dibinde kalan kısım atıldı. Yeni tüplere filtreli kolonlar aktarıldı.

9. 500 µl tampon BW eklendi ve 1 dk 10000 devirde santrifüj edildi. Sonrasında tüpün alt kısmı boşaltıldı.

10. 600 µl B5 filtreli kolon üzerine eklendi ve 1 dk 10000 devirde santrifüj edildi. Sonrasında tüpün alt kısmı boşaltıldı (Buffer B5 konsantre halde bulunuyor, içine 28 ml etanol eklenerek kullanıma hazır hale getiriliyor).



11. Filtreli spin klonlar boş olarak 1 dk 10000 devirde santrifuj edildi.
12. Filtreli kolonlar 1,5 ml ependorf tüplere aktarıldı.
13. Buffer BE kullanılmadan önce 50 °C etüvde ısıtıldı. Filtreli kolonlar üzerine Buffer BE 100 µl eklendi ve 1 dk 10000 devirde santrifuj edildi.
14. Santrifuj sonrasında filtreli kolonlar atıldı ve 1,5 ml ependorf tüplerin alt kısmında kalan 100 µl DNA kullanıma hazır hale geldi.
15. Hazırlanan DNA örnekleri -20°C saklandı.

### **3.2.2. Multipleks PZR amplifikasyonu**

#### **Hyplex CarbOxa ID PZR modülünün kit içeriği**

- Primer mix
- Nükleotid karışım ( dATP, dCTP, dGTP, dTTP içerir)
- Pozitif kontrol
- Negatif kontrol
- Kırılabilir pozitif kontrol probu
- 10x PZR tampon
- DNA polimeraz

Ekstraksiyon işlemi yapılan *Pseudomonas* suşlarından elde edilen DNA örneklerine primerleri kullanılarak Multipleks PZR işlemi uygulandı. Amplifikasyon için küçük ependorf tüplere 5 µl 10xPCR buffer, 1 µl nükleotid mix, 2 µl primer mix, 1 µl DNA polimeraz, 5 µl örnek DNA'sı ve 36 µl çift distile su konularak toplam hacim 50 µl'ye tamamlandı. Örnekler Thermal Cycler cihazına (Sensoquest Labcycler, Technomed, Almanya) yüklendi. Amplifikasyon aşamaları termal döngü cihazında aşağıdaki döngü sırasına göre tamamlandı:

1. 94 °C' de 5 dakika ilk denatürasyon
2. 94 °C' de 25 saniye denatürasyon
3. 52 °C' de 25 saniye primerlerin bağlanması ( annealing)
4. 72 °C' de 45 saniye uzama (ekstensiyon)
5. 72 °C' de 3 dakika son uzama

2. , 3. ve 4. aşamalar 35 kere tekrarlandı. PZR tamamlandıktan sonra örnekler hibridizasyon aşamasına kadar – 20 °C'de saklandı.

### **3.2.3. Hibridizasyon alışması**

#### **Hibridizasyon modülünün içeriği**

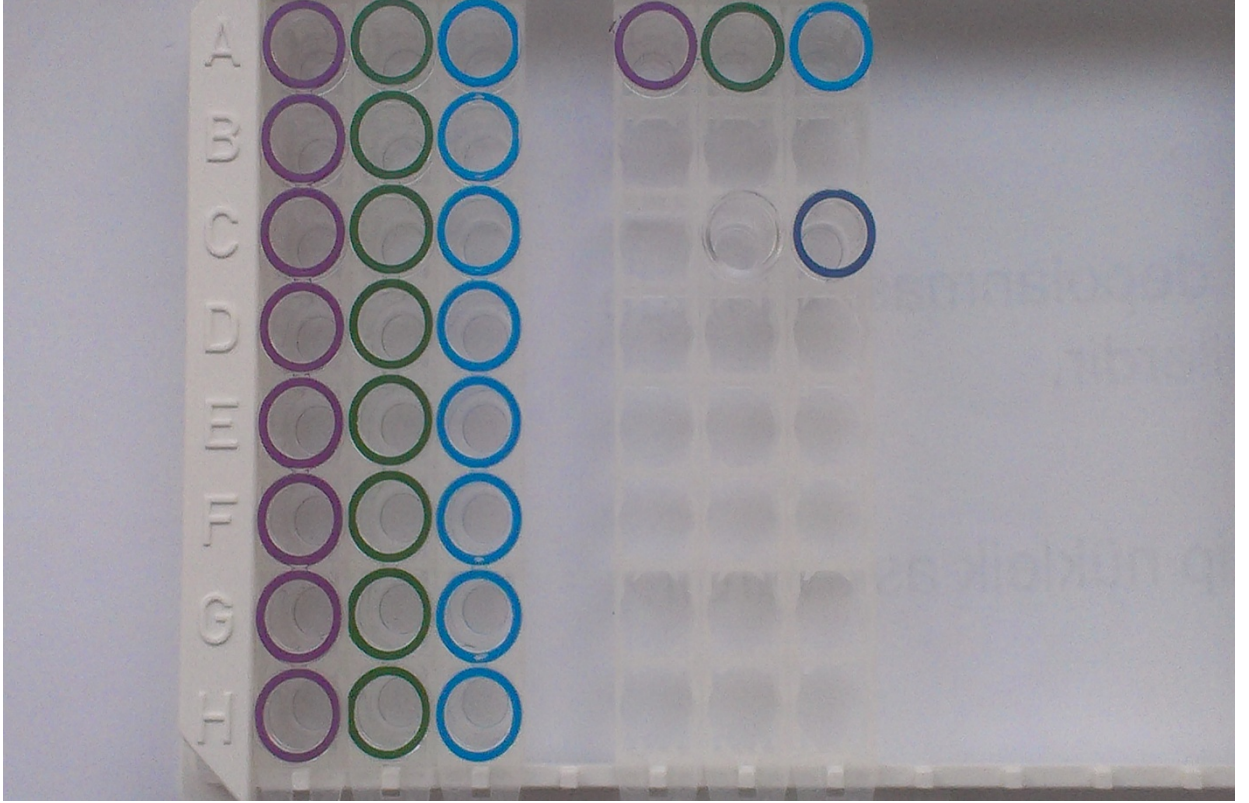
- Hibridizasyon buffer
- Stringent yıkama solüsyon
- Yıkama tamponu
- Konjugat
- TMB ( Tetramethylbenzidine) substrat solüsyonu
- Stop solüsyonu
- Spesifik oligonükleotid problemleri için kırılabilir renkli kuyucuklar
- Reagent kontrol

#### **Hibridizasyon alıřma prosedürü**

alışması ncesinde PZR rnekleri thermal cycler cihazında 10 dakika 95 C’de denatüre edildi. Sonrasında 2 dakika buz üzerinde bekletildi.

Hibridizasyon çalışmasına başlamadan önce her örnek için 3 adet kuyucuk hazırlandı. Farklı renklerdeki kuyucukların her biri bir gen bölgesini temsil etmektedir. Mor renkli kuyucuk OXA-23 genini, koyu yeşil kuyucuk OXA-40 genini, mavi kuyucuk ise OXA-58 genini göstermektedir. PZR negatif kontrol için de üç kuyucuk hazırlandı (mor, koyu yeşil, mavi). PZR pozitif kontrol için 1 tane koyu mavi olan kuyucuk, blank için de 1 adet renksiz kuyucuk kullanıldı.

**Şekil 3.1.** Plate üzerinde gen bölgelerine ait kuyucukların görüntüsü.



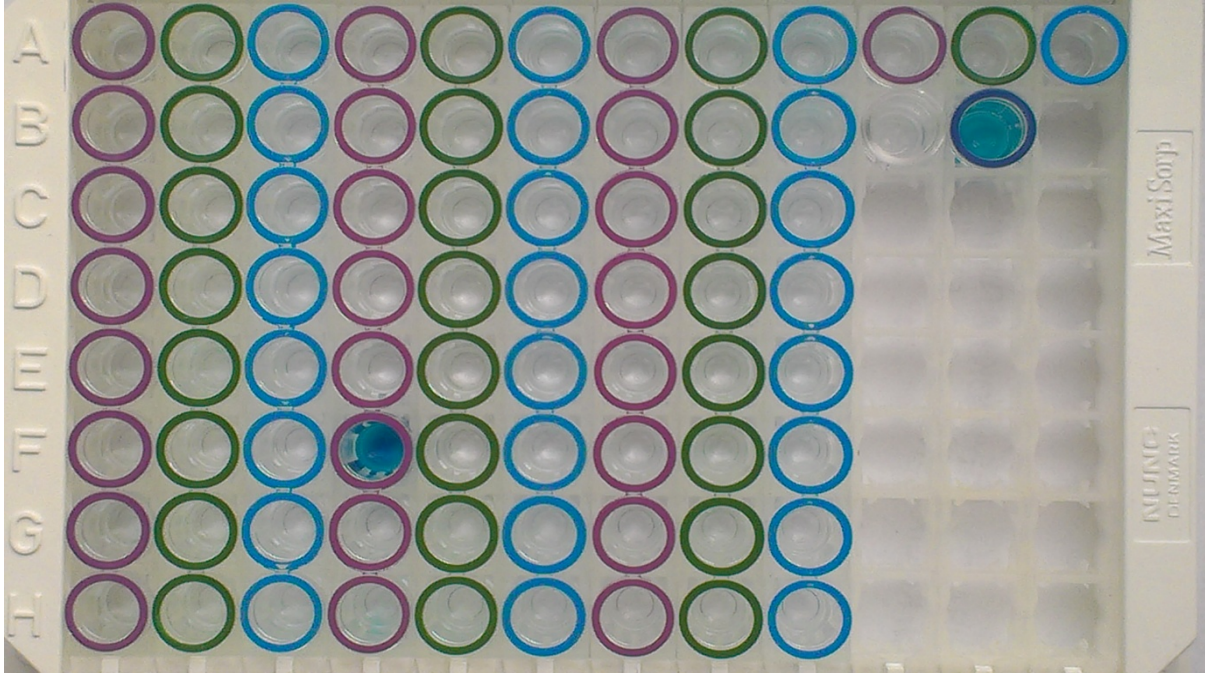
Sonrasında her kuyucuk için 50 hibridizasyon tamponu ve 5 µl denatüre PZR ürünü eklendi. Kuyucuklara örnek eklendikten sonra örneklerin üzeri kapatıldı. Sonrasında etüvde 50 °C de 30 dk bırakıldı. İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki örnekler döküldü. 50 °C etüvde önceden ısıtılmış 200 µl Stringent yıkama solüsyon her bir kuyucuğa konulup dökülerek yıkama yapıldı. Bu işlem üç defa tekrarlandı. Sonra 200 µl yıkama tamponu ile son bir yıkama yapıldı. İyice vurarak kuyucuklar kurutuldu (Yıkama tamponu 1'e 20 oranında distile su ile karıştırılarak hazırlandı).

Örnek başına 1 konjugat 100 yıkama tamponu olacak şekilde konjugat hazırlandı. 100 µl konjugat kuyucuklara eklendi ve 30 dakika oda ısısında inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun sonunda 200 µl Washing Buffer ile 3 defa daha yıkama yapıldı. 100 µl substrate eklendi ve 15 dakika karanlıkta inkübe edildi. İnkübasyon sonunda 100 µl stop solüsyonu eklendi ve kuyucuklardaki renk değişimi izlendi. Renk değişimi belirgin olup, gözle ayırt edilebilir şekilde oluştu. Sonuçların daha objektif olarak elde edilmesi için son

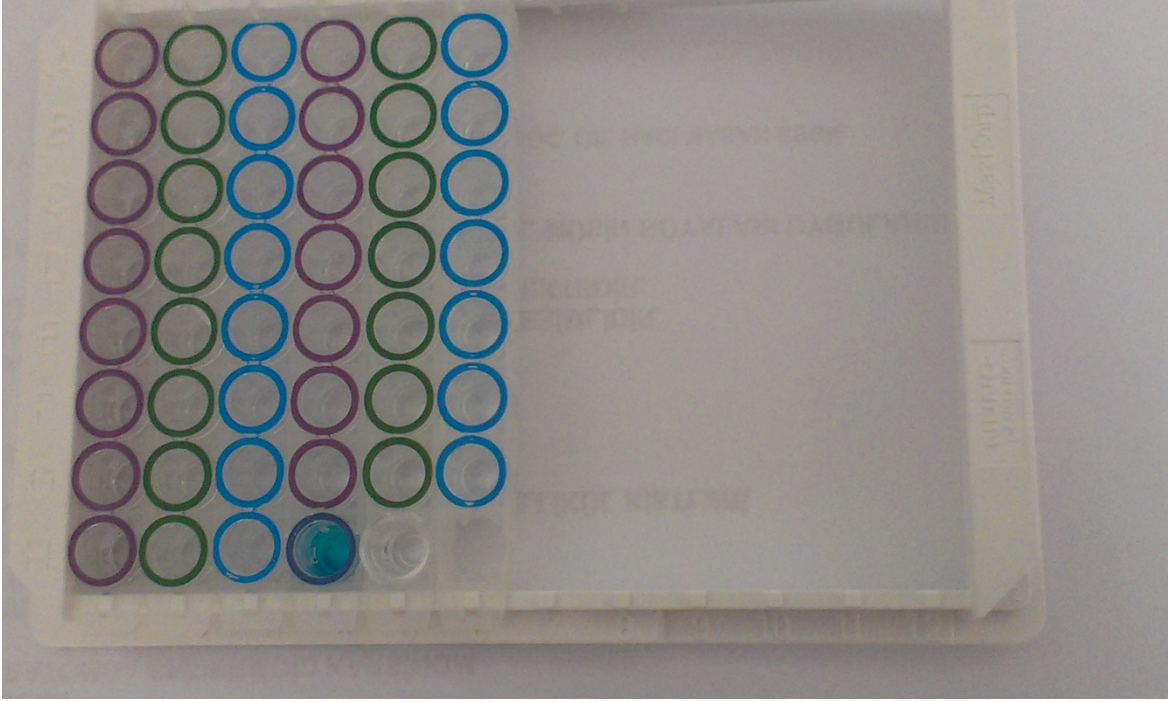
aşamada örnekler fotometrede 450 nm dalga boyunda okutuldu. Fotometrede reagent kontrol ve negative kontrolün  $\leq 0.200$ , pozitif kontrolün  $\geq 1.500$  olması durumunda çalışma prosedürü başarılı kabul edilip sonuçlar değerlendirildi. Örnekler için  $\geq 0.400$  olanlar pozitif, 0.200- 0.400 arasındakiler borderline,  $\leq 0.200$  olanlar negatif kabul edildi.

**Şekil 3.2.** Mikrolakta OXA-23 pozitifliğinin görüntüsü

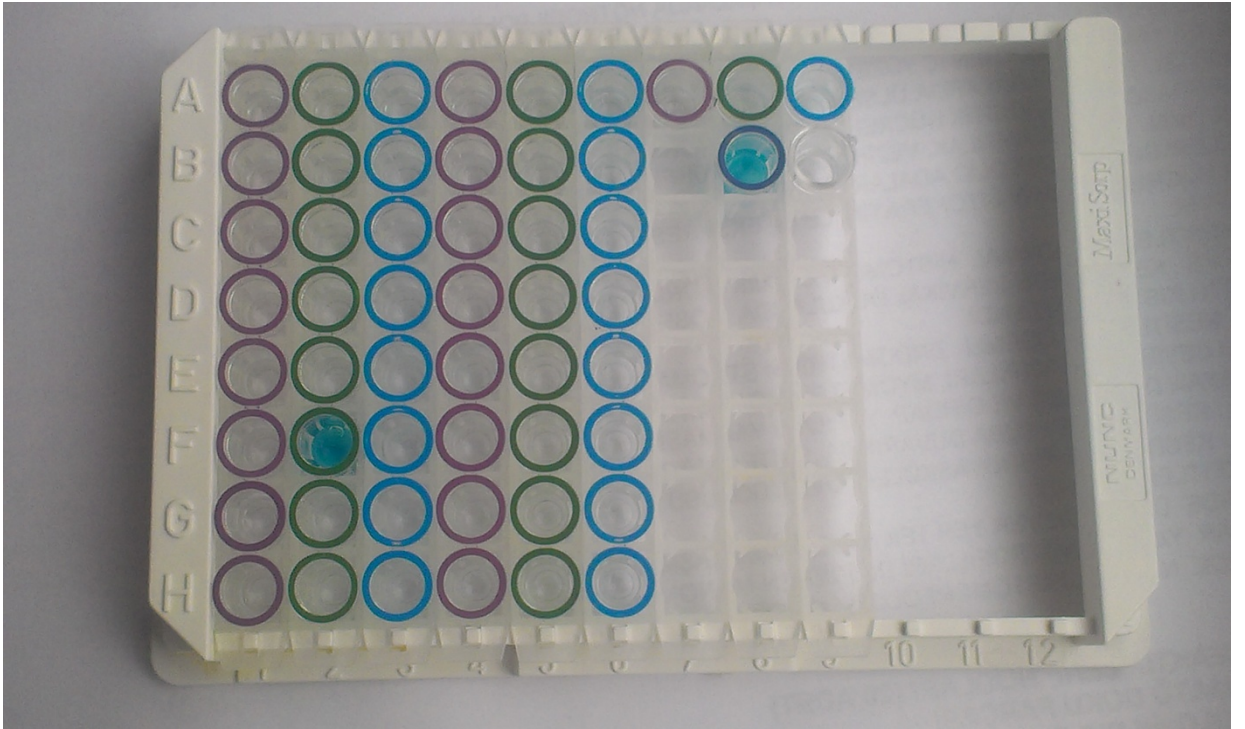




**Şekil 3.3.** Mikroplakta Pozitif kontrolün görüntüsü



**Şekil 3.4.** Mikroplakta OXA-40 pozitifliğinin görüntüsü



#### 4. BULGULAR

Çalışmaya Kasım 2011 – Ekim 2013 tarihleri arasında Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na bakteriyolojik kültür için gönderilen klinik örneklerden izole edilen, otomatize sistem ve konvansiyonel bakteriyolojik yöntemler ile *Pseudomonas spp.* olarak tiplendirilen ve IMP ve/ veya MEM'e dirençli olan 184 örnek dahil edildi.

Çalışmaya dahil edilen 184 test izolatında multipleks PZR yöntemi ile karbapenem direnci ile ilişkili olduğu düşünülen gen bölgeleri araştırılmıştır.

Çalışmaya alınan hastaların 117'si (%63.5) erkek, 67'si (%36.5) kadın hastalardan oluşmaktadır. Hastalar 1-89 yaşları (ortalama 35.29 yaş) arasındaydı.

OXA-23 pozitifliği saptanan 12 hastanın 7'si (% 58.3) erkek, 5'i (% 41.6) kadın hastalardı ve 12-73 yaşları arasında olup yaş ortalaması 48.5 olarak hesaplandı. OXA-23 pozitif olan örneklerin 8'i (%66.6) reanimasyon YBÜ'den, 3'ü (%25) acil YBÜ'den olup tek bir pozitiflik de plastik cerrahi kliniğinden gelen örnekte bulunmuştur. Bu örneklerin 5'i (% 41.6) BAL'dan, 3'ü (%25) yaradan, 2'si(%16.6) trakeal aspirasyon mayisinden ve 1 örnek (%8.3) kandan, 1 örnekte (%8.3) kataterden izole edilmiştir.

OXA-40 pozitifliği reanimasyon YBÜ'den 54 yaşındaki bir erkek hastanın bronko-alveoler lavajından izole edilmiş, OXA-58 pozitifliği ise yine reanimasyon YBÜ'deki 58 yaşında olan bir başka erkek hastanın yara kültürü örneğinden izole edilmiştir. OXA-23, OXA-40, OXA-58 pozitifliği saptanan hastaların demografik verileri Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** OXA-23, OXA-40, OXA-58 pozitifliği saptanan hastaların demografik verileri

<b>OXA pozitifliği saptanan hastalar</b>		<b>Örnek tipi</b>	<b>Yaş</b>	<b>Cinsiyet</b>	<b>Geldiği klinik</b>
<b>OXA-23 pozitifliği saptanan hastalar</b>	1. Hasta	Kan	73	Kadın	Reanimasyon YBÜ
	2. Hasta	Yara	51	Erkek	Reanimasyon YBÜ
	3. Hasta	Bronkoalveoler lavaj	45	Kadın	Reanimasyon YBÜ
	4. Hasta	Trakeal aspirasyon mayi	53	Kadın	Acil YBÜ
	5. Hasta	Trakeal aspirasyon mayi	12	Kadın	Acil YBÜ
	6. Hasta	Bronkoalveoler lavaj	35	Erkek	Reanimasyon YBÜ
	7. Hasta	Yara	59	Erkek	Plastik cerrahi kliniği
	8. Hasta	Bronkoalveoler lavaj	74	Erkek	Reanimasyon YBÜ
	9. Hasta	Bronkoalveoler lavaj	40	Erkek	Reanimasyon YBÜ
	10. Hasta	Yara	19	Erkek	Reanimasyon YBÜ
	11. Hasta	Bronkoalveoler lavaj	70	Kadın	Reanimasyon YBÜ
	12. Hasta	Katater	51	Erkek	Acil YBÜ
<b>OXA-40 pozitifliği saptanan hasta</b>		Bronkoalveoler lavaj	54	Erkek	Reanimasyon YBÜ
<b>OXA-58 pozitifliği saptanan hasta</b>		Yara	58	Erkek	Reanimasyon YBÜ

Bu çalışmada *Pseudomonas*'larda karbapenem direncine en sık (% 32.6 ) reanimasyon YBÜ'sinde rastlandı. Bunu pediatri klinikleri (%13.5) ve çocuk YBÜ'si (%11.9) izlemektedir. Karbapenem dirençli 184 *Pseudomonas* suşundan 129' u (%70.1) çeşitli yoğun bakım ünitelerinden gelen örneklerden üretilmiştir ve klinik örneklerin çoğunluğu (%46.1) bronkoalveoler lavaj (BAL)'dan izole edilmiştir. Örneklerin izole edildiği kliniklere göre dağılımı tablo Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.2.** Karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının izole edildiği kliniklerin dağılımı

<b>Klinik</b>	<b>Suş sayısı</b>	<b>Suş yüzdesi(%)</b>
Reanimasyon Yoğun Bakım Ünitesi	60	% 32.6
Pediyatri klinikleri	25	% 13.6
Çocuk YBÜ*	22	% 11.9
Acil YBÜ	17	% 9.2
Göğüs hastalıkları YBÜ	15	% 8.1
Plastik Cerrahi kliniği	15	% 8.1
Genel cerrahi YBÜ	7	% 3.8
Dahiliye YBÜ	5	% 2.7
Üroloji kliniği	4	% 2.2
Nöroşiruji YBÜ	2	% 1.1
Dahiliye klinikleri	2	% 1.1
Tıbbi onkoloji kliniği	3	% 1.6
Göğüs hastalıkları kliniği	2	% 1.1
Fizik tedavi kliniği	2	% 1.1
Ortopedi kliniği	1	% 0.5
Nöroloji kliniği	1	% 0.5
Kardiyoloji YBÜ	1	% 0.5
<b>TOPLAM</b>	<b>184</b>	

\*YBÜ: Yoğun Bakım Ünitesi.

Karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının 85'i (%46.1) BAL'dan, 31'i (%16.8 ) yaradan, 18'i (%9.7) trakeal aspirasyon mayisinden, 16' sı (%8.6) idrardan, 14'ü (%7.6) kandan, 10'u (%5.4) balgamdan, 3'ü (% 1.6) kataterden, 1 tanesi (% 0.5) apsedan, 1 tanesi de (% 0.5) peritondan izole edilmiştir (Tablo 4.3)



**Tablo 4.3.** Karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının izole edildiği klinik materyal

İzole edilen klinik materyal	Suş sayısı	Suş%
Bronkoalveoler lavaj	85	% 46.1
Yara	31	% 16.8
Trakeal aspirasyon mayi	18	% 9.7
İdrar	16	% 8.6
Kan	14	% 7.6
Balgam	10	% 5.4
Boğaz	3	% 1.6
Drenaj mai	2	% 1.1
Katater	3	% 1.6
Apse	1	% 0.5
Periton	1	% 0.5
TOPLAM	184	

184 örneğin 12'sinde OXA-23 pozitifliği, bir örnekte OXA-40 pozitifliği, yine tek bir örnekte de OXA-58 pozitifliği saptanmıştır. Çalışılan örneklerdeki pozitiflik oranları Tablo 4.4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** OXA-23, OXA-40, OXA-58 genlerinin bulunma sıklığı

OXA geni	Pozitif sayısı	Pozitif yüzdesi (%)
OXA-23	12	<b>% 6.5</b>
OXA-40	1	% 0.54
OXA-58	1	% 0.54
TOPLAM	14	<b>% 7.6</b>

## 5. TARTIŞMA

*Pseudomonas*'lar, artan antibiyotik direnci ile önemli bir sorun haline gelen, özellikle yoğun bakım ünitelerinde hastane infeksiyonlarındaki rollerinden dolayı infeksiyon hastalıkları alanında önemli bir yere sahip olan mikroorganizmalardır. Değişik çalışmalarda hastane infeksiyonlarının % 8-25' inden sorumlu tutulmuşlardır (Fidan 2005).

*Pseudomonas*'lar farklı vücut bölgelerinden izole edilebilmektedirler. Turgut ve ark.'ları (2002) yapmış oldukları çalışmada, *P. aeruginosa* kökenlerini %39.5 ile en sık idrardan ve %37.2 ile ikinci sıklıkta trakeal aspirattan, %20.6 ile üçüncü sıklıkta ise yara örneklerinden izole ettiklerini bildirmişlerdir. Akçay ve ark.'ları (2003) ise çalışmalarında, *P. aeruginosa* kökenlerini %45 ile en sık trakeal aspirat örneklerinden, ikinci sıklıkta %23 ile idrar örneklerinden, üçüncü sıklıkta %21 ile yara örneklerinden elde etmişlerdir. Yücel ve ark.(2006)'nın yaptığı başka bir çalışmada 265 *P.aeruginosa* suşunun % 22'si trakeal aspirattan, %22'si idrardan, % 15'i yaradan, % 14'ü balgamdan, % 12'si bronkoalveoler lavajdan, %8'i kandan izole edilmiştir. Gayyurhan ve ark.'ları (2008) , YBÜ'lerinde yatmakta olan hastalardan 89 *P. aeruginosa* suşu izole etmişler, bu suşlar arasında en sık izole edilen örnek tiplerinin; trakeal aspirat (%37.07), idrar (%19.10) ve yara (%14.60) olduğunu bildirmişlerdir. Dündar ve ark.'larının (2009), üç yıllık süreçte izole ettikleri 665 *Pseudomonas* suşundan % 28'i idrardan, %27'si solunum sistemi örneklerinden, %27' si de deri-yumuşak doku materyalinden elde edilmiştir. Anabilim dalımızdan hastanemizde yapılan bir çalışmada, 159 *Pseudomonas* suşunun %34'ü yaradan, % 33'ü trakeal aspirattan, %12.5'i bronkoalveoler lavajdan, %8'i idrardan, %8'i kandan izole edilmiştir (Özdemir 2009).

Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda *P. aeruginosa* kökenleri en sık YBÜ'lerinden ve sıklık sırasına göre trakeal aspirat, idrar ve yara yeri örneklerinden izole edilmiştir (Ersöz 2002, Şengöz 2005). Bu çalışmada, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na gönderilen ve karbapenem dirençli *Pseudomonas* tespit edilen örneklerin % 46.1'i bronke alveoler lavaj, % 16.8'i yara, % 9.7'si trakeal aspirasyon mayi, % 8.6'sı ise idrar örneğidir.

*P. aeruginosa* suşları bazı kliniklerden daha sık izole edilmektedir. *P. aeruginosa* suşlarının kliniklere göre dağılımının incelendiği Bayramoğlunun (2004) çalışmasında; *P. aeruginosa* kökenleri en sık pediatri kliniklerinden (%32.4), ikinci sıklıkta YBÜ'den (%9.9), üçüncü sıklıkta ise genel cerrahi kliniğinden (%7) elde edilmiştir. Gündüz ve ark. (2003) ise, *P. aeruginosa* kökenlerini en sık YBÜ'den (%43.3), ikinci sıklıkta kulak burun boğaz kliniğinden (%18), üçüncü sıklıkta cerrahi kliniğinden (%8.6) saptadıklarını bildirmişlerdir. Öztürk ve ark.'nın (2011) çalışmasında 100 *P. aeruginosa* suşunun 18'i IMP dirençli

bulunmuş olup bunların %55.5'i YBÜ'lerinden, %22'si cerrahi kliniklerinden, %11'i dahili kliniklerden gelmiştir. Çalışmamızda ise karbapenem dirençli olan *Pseudomonas*ların % 70'i YBÜ'lerinden izole edilmiştir. Geri kalan %30 luk dilimin içinde ilk sırayı %13'lük oranla pediatri klinikleri almıştır. Diğer klinikler yakın oranlarla birbirlerini izlemektedir. Yoğun bakım ünitelerinden ise ilk sırada %32.6 oranla reanimasyon YBÜ, ikinci sırada %11.9 ile çocuk YBÜ, üçüncü sırada ise %9.2 lik oranla acil YBÜ gelmektedir.

Karbapenemler bilinen en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerdir. Yaşamı tehdit eden ciddi infeksiyonlarda ve çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif bakterilerin yol açtığı infeksiyonlarda karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Direnç oranları ve dirençten sorumlu olabilecek olası enzimler her ülke ve merkeze göre değişiklikler göstermekle birlikte her merkez için değişmeyen bir gerçek, oranların yıllar içinde artmakta olduğudur (Fritshe 2005).

Genel olarak IMP ve MEM duyarlılığının birbirine paralel olduğu kabul edilmekte ve CLSI tarafından her iki karbapenemin antibiyogram değerlendirilmesinde birbirini temsil edebileceği önerilmektedir. Ancak, farklı porin veya pompa-efluks sistemleri nedeniyle IMP ve MEM birbirinden bağımsız duyarlılıklara sahip olabilirler (Bal 1995).

Amerika Birleşik Devletleri'nde IDSA (The Infectious Diseases Society of America) çalışmasının 1992-2004 yıllarına ait verilerine göre çoklu ilaca dirençli *P. aeruginosa* suşlarının %21-32 arasında değiştiği (Kunz 2010); EARSNet (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) çalışmasının 2005-2011 yıllarına ait verilerine göre ise *P. aeruginosa* izolatlarında karbapenem direncinin %18,6; çoklu ilaç direncinin %15,3 olduğu bildirilmiştir (European Centre 2011).

Ülkemizde de *Pseudomonas*'larda IMP direnci coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir (Bayraktar 2004, Tatman Oktun 2004). Türkiye için EARSS 2009 yılı verilerinde *P.aeruginosa* için saptanan direnç oranlarında karbapenem direnci %27.2 olarak verilmiştir (Gülmez 2011).

Özdemir ve ark.'larının 2009'da hastanemizde yaptıkları çalışmada hastane infeksiyonu etkeni 159 *Pseudomonas* suşunda IMP direnci %54 olarak bulunmuştur.

Arabacı ve ark.'nın çalışmasında (2010) yoğun bakım ünitelerindeki hastalardan izole edilen 108 *Pseudomonas* suşunda IMP direnci % 18.5, MEM direnci % 22.5 bulunmuştur.

Paköz ve ark.'nın çalışmasında (2011), 154 *Pseudomonas* suşunda IMP direnci % 36 olarak bulunmuştur. Öztürk ve ark.'nın (2011) çalışmasında ise IMP direnci %18 olarak bildirilmiştir.

Türkiye’de yurt dışı verilerle karşılaştırıldığında çok yüksek karbapenem direnci bildirilmemektedir. Karbapenemaz aktivitesi eş zamanlı çoklu ilaç direnç gelişimini de beraberinde taşıyarak yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara neden olmaktadır. Bu nedenle özellikle yoğun bakım ünitelerinde ciddi infeksiyonlarda karbapenem duyarlılığını doğru ve mümkün olan en kısa sürede belirlemek etken bakterinin izole edildiği hasta için yaşamsal önem taşımaktadır.

Çoklu ilaca direnç durumu, *Pseudomonas* suşlarında sık gözlenen bir durumdur. Çoklu ilaca direnç tanımı, antipsödomonal penisilin ve sefalosporinler, beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri, aminoglikozidler, tetrasiklinler, florokinolonlar, trimetoprim-sulfametoksazol ve karbapenemlerden en az üçüne direnç durumunu ifade etmektedir (Demirdağ 2011).

*Pseudomonas* suşlarında direnç gelişimi, porin mutasyonları, aktif pompa (efluks) sisteminin uyarılması, DNA topoizomeras IV gibi hedeflerde değişim oluşması, AmpC beta-laktamaz, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (PER-1, OXA, TEM-24), metallo-beta-laktamaz, karbapenemazlar gibi enzimlerle oluşan enzimatik inaktivasyon gibi mekanizmalarla meydana gelmektedir (Öztürk 2008).

Bu çalışmaya karbapenem direnci tespit ettiğimiz 184 örnek alınmış olup, bu örneklerde karbapenem direncine sebep olabilecek OXA karbapenemazlardan OXA-23, OXA-40, OXA- 58 genleri araştırılmış, sıklığı tespit edilmiştir. Böylelikle son yıllarda gittikçe artan oranlarda rastladığımız *Pseudomonas*’lardaki karbapenem direnci ile ilgili direnç mekanizmaları genetik düzeyde araştırılmıştır. Dirence neden olan enzimlerin sentezlenmesinde rol alan gen bölgelerinin varlığı veya yokluğunun tespiti hedeflenmiştir.

Karbapenem direncine yol açan en önemli faktör karbapenemazların varlığıdır. Bu karbapenemazlardan *P. aeruginosa*’da sınıf B metallo beta-laktamazlar hakim iken, *A.baumannii*’de sınıf D oksasilinazlar hakimdir (Sevillano 2009). Sınıf D beta-laktamaz olarak bilinen OXA karbapenemazlar sıklıkla *A.baumannii* suşlarında bulunmuştur (Walsh 2008).

OXA enzimlerini tespit eden güvenilirliği onaylanmış ve standardize edilmiş fenotipik bir test günümüze kadar geliştirilememiştir. Bu enzimler ancak PZR gibi moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilebilmektedir (Figueiredo 2012).

Bu çalışmada multipleks PZR yöntemi ile OXA-23, OXA-40 ve OXA-58 genleri araştırılmıştır. Çalışmada karbapenem dirençli 184 örnek arasında 12 örnekte OXA-23 pozitifliği, 1 örnekte OXA-40 pozitifliği ve 1 örnekte de OXA-58 pozitifliği tespit

edilmiştir. OXA-23 tipi enzimlerin dünya genelinde en sık rastlanan sınıf D karbapenemaz olduğu bildirilmiştir (Naas 1999, Peleg 2008).

Bu çalıştığımız OXA genleri karbapenemazların sınıf D ailesindeki karbapenemleri hidrolize eden oksasilinazlar (KHO) grubundandır. KHO'lar, OXA-23-27-49 (grup 1), OXA 24-25-26-40-72(grup 2), OXA-58 (grup 3), OXA-51 (grup 4) olarak gruplandırılmaktadır (Vahapoğlu 2006, Walther-Rasmussen 2006, Miriagou 2010).

OXA karbapenemazların büyük çoğunluğu fırsatçı Gram-negatif patojen olan *Acinetobacter baumannii*'de tespit edilmiştir (Queenan 2007). KHO'ların *A. baumannii* tipine spesifik olduğu düşünüldüğünden hemen hemen tüm çalışmalar *Acinetobacter*'lerde yoğunlaşmıştır. *Acinetobacter*lerdeki OXA karbapenemazlara dair çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

Karunasagar ve ark.'larının 2011 yılında 62 *Acinetobacter* spp. suşlarındaki OXA-23, OXA-24/40, OXA-58 pozitiflik oranları sırasıyla % 47.9, % 22.9, % 4.2 olarak bulunmuştur. Vranić-Ladavac ve ark.'nın (2013) yaptıkları çalışmada 64 karbapenem dirençli *A.baumannii* suşlarının % 69'unda OXA karbapenemaz enzimleri saptanmış olup OXA-23 %9 oranında, OXA-24/40 %27 oranında, OXA-58 ise %33 oranında bulunmuştur.

Türkiye'de yapılan çalışmalarda *Acinetobacter*'lerde OXA-23 grubu ve OXA-58 grubu enzim üreten suşlara ait salgınlar bildirilmiştir (Gür 2008, Ozen 2009). Güçlü' nün (2011) ülkemizde yapılan tez çalışmasında 61 *A.baumannii* izolatında % 81.9 OXA-23 pozitifliği, % 18 OXA-58 pozitifliği saptanırken, OXA-24/40 geni bulunamamıştır. 2013 yılında ise Sarı ve ark.'ları OXA-24/40 grubu enzim üreten *Acinetobacter*'lere ait bir salgın bildirmişlerdir. Gökmen ve ark.'larının (2012) çalışmasında da yanık ünitesinden izole edilen 11 karbapenem dirençli *A.baumannii* suşunda OXA-23 ve OXA-58 genlerine rastlanmazken 3 örnekte (%27.2 oranında) OXA-24 geni tespit edilmiştir.

*Acinetobacter*'ler dışında bir bakteride OXA karbapenemazların varlığı, ilk kez Fransa'da yapılan bir çalışmada bildirilmiştir. Fransa'da 1996 ile 1999 yılları arasında farklı hastalardan toplanan 10 *Proteus mirabilis* suşunda kromozomal yerleşimli OXA-23 geni tespit edilmiştir. *Proteus mirabilis* suşunda bulunan OXA-23 geninin genetik yapısı *A.baumannii*'deki OXA-23 geni ile aynı bulunmuştur. OXA-23 üreten *Proteus mirabilis* izolatlarının IMP için MİK değerleri 0.25 ile 0.50 µg/ml arasında, MEM için 2 ile 4 µg/ml arasında olup karbapenem direnci gözlenmemiştir. Bu çalışmada OXA-23 enziminin karbapenem direncine etkisini göstermek için OXA-23 kodlayan plazmid ile *Escherichia coli* ve *P. mirabilis* suşundan rekombinasyon suşları oluşturulmuş ve rekombine suşun MİK değerlerinde yükselme tespit edilmiştir. Bu MİK değerlerindeki artış OXA-23 varlığı ile

ilişkilendirilmiştir (Bonnet 2002). OXA tipi karbapenemazların çoğu IMP ve özellikle MEM karşı zayıf hidrolitik aktivite gösterirler. Ayrıca dış membran proteinlerinin kaybı veya efluks pompalarının artmış aktivitesi ile birlikte olduklarında daha geniş spektrumlu direncin gelişmesine neden olurlar (Poirel 2010).

Bonnet ve ark.'larının (2002) çalışmasında, *Enterobakter*'lerde bu OXA genleri kazanılabiliyorken, bu genlerin diğer bakteriyel ailelere dağılımını engelleyen bilinmeyen faktörler olabileceği belirtilmiştir. OXA-23 kodlayan plazmid *P. mirabilis* suşuna kazandırılabilmesine rağmen plazmid bu suşta çoğalamamaktadır. OXA-23 geninin bu suşta sürdürülebilmesi için muhtemelen rekombinasyon, kointegrasyon, veya transpozisyon gibi genetik olaylarla plazmidin kromozoma bağlanması gerektiği bildirilmiştir (Bonnet 2002).

Karbapenemazların enterik Gram negatif bakteriler (EGNB)'de yayılımı önem arz etmektedir çünkü hastane kaynaklı EGNB izolatlarında giderek artan GSBL oranlarıyla birlikte değerlendirildiğinde, karbapenemaz aktivitesi eş zamanlı çoklu ilaç direnç gelişimini de beraberinde taşıyarak yüksek mortalite ile seyreden infeksiyonlara neden olmaktadır (Budak 2012).

*Pseudomonas*'lardaki en önemli direnç mekanizmalarından biri olan karbapenemaz enzimleri içerisinde en önemlileri metallo beta laktamaz enzimleridir ( Mansur 2013). OXA karbapenemazlar, MBL ile kıyaslandığında daha zayıf hidrolitik aktiviteye sahiptirler ve bu geni barındıran suşlar IMP ve MER için dirençlilik sınırını oluşturan MİK konsantrasyonlarına ulaşmak için ek direnç mekanizmalarına (efflux ve permeabilite azalması gibi) ihtiyaç duyabilirler (Walsh 2008).

*Pseudomonas*'larda çeşitli OXA tipi enzimler tanımlanmış olmasına rağmen bunlardan çok azı karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. Girlich ve ark.'larının yaptığı bir çalışmada (2004); silikoda bulunan bir *P. aeruginosa* suşunda doğal olarak bulunan bir oksasilinaz olan OXA-50 geni tanımlanmıştır. Bu genin *A.baumannii*'deki OXA-23 ve OXA-27 genleri ile sırasıyla %44 ve %43 homoloji gösterdiği belirtilmiştir. OXA-50 geninin dendrogramdaki yeri Şekil 5.1'de görülmektedir. Çalışmanın devamında OXA-50 geni çok kopyalı bir plazmid üzerine klonlanmış ve *P. aeruginosa* ve *E. coli*'ye eksprese edilmiştir. Bu durumun *E. coli*'de meropenem duyarlılığını değiştirmediğini ancak *P. aeruginosa*'da meropenem duyarlılığını azalttığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *pickettii*, *Aeromonas* spp., *Shewanella* spp. ve *P. aeruginosa* gibi gram negatif bakterilerin oksasilinaz genleri için önemli bir rezervuar olduğu vurgulanmıştır.

2009 yılında ilk olarak 2 *P. aeruginosa* suşunda plazmid üzerinde yer alan OXA-40 geni gösterilmiştir ve bu genin *A.baumannii*'deki OXA-40 geni ile %100 homoloji gösterdiği

belirtilmiştir. Daha önce bildirilen raporların çoğunda, OXA-40 geninin *A.baumannii*'de yalnızca kromozomda yerleştiği belirtilmiş olmasına rağmen bu çalışmada OXA-40 geninin plazmid üzerinde yer aldığı gösterilmiştir (Sevillano 2009). Amerika Birleşik Devletlerinden yapılan bir çalışmada bu genin her iki lokalizasyonda da yer alabileceği bildirilmiştir (Lolans 2006).

Karbapenemleri hidrolize edebilen OXA enzimleri sıklıkla *A. baumannii*'de bulunur ve kromozomal genler tarafından üretilir. *Enterobacteriaceae*'da plazmid kaynaklı OXA-23 ve OXA-48 enzimleri de tanımlanmıştır (Bush 2010). OXA-23 ve OXA-58 genleri genellikle plazmidten izole edilmektedir, OXA-40 ise kromozomda lokalize olmaktadır. Ancak bugüne kadar *Acinetobacter*'de tanımlanan KHO'ların kromozomal olarak kodlandığı gözlenmiştir (Poirel 2006).

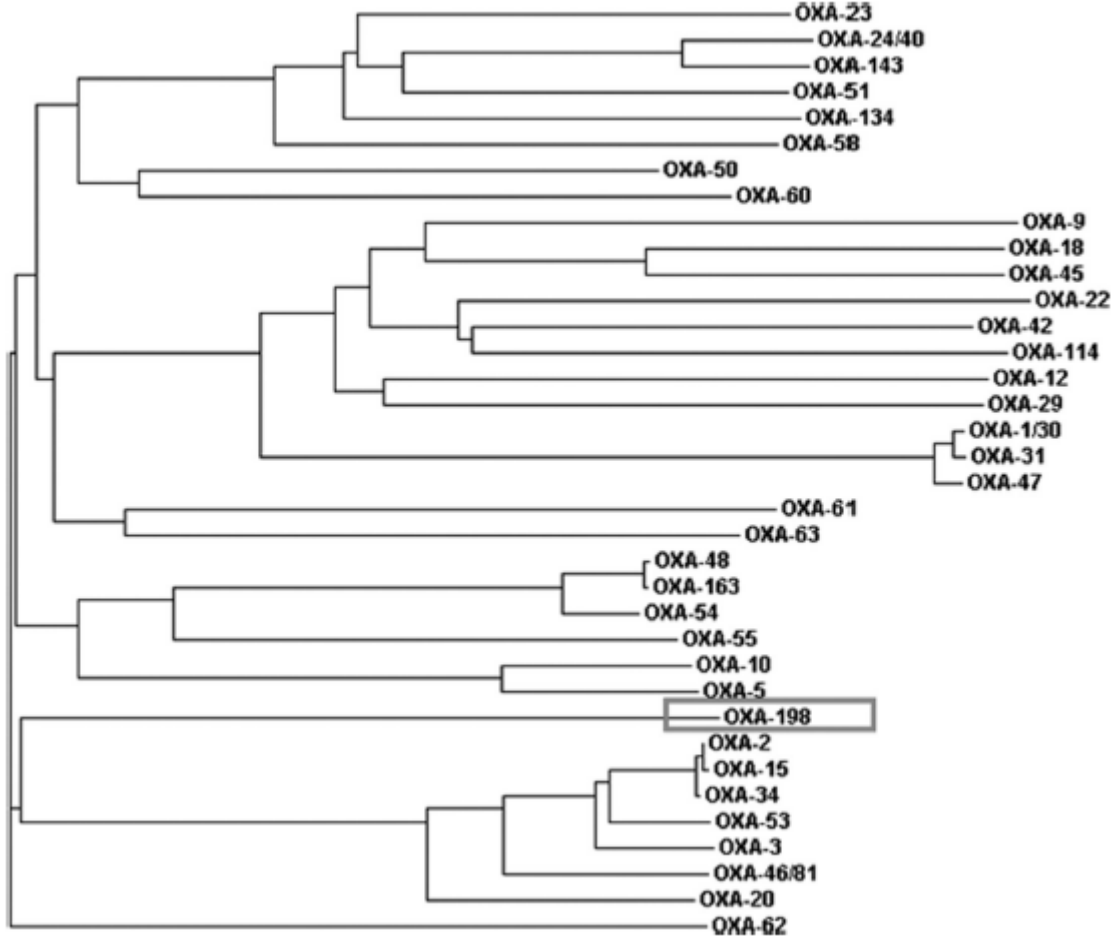
Plazmidler bakteri kromozomundan bağımsız kendi kendine replike olabilen ekstrakromozomal küçük genetik yapılardır. Bakteriler arasında genetik madde aktarımında temel mekanizmalardan biri olan konjugasyonda rol oynarlar. Konjugasyon genetik olarak farklı özellikler gösteren iki bakterinin yan yana gelmeleri ve aralarında oluşan geçici hücreler arası bağlantı ile bir bakteriden diğerine genetik madde aktarılmasıdır ve ekstrakromozomal bir DNA parçası olan plazmid ile yönetilir. Dolayısıyla bu genlerin plazmid üzerinde bulunması aktarılabilir olmalarını kolaylaştıracaktır.

Garch ve ark.'nın yaptığı çalışmada (2011) KHO'lardan yeni bir grup olduğu belirtilen OXA-198 enzimi bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur (Şekil 5.1). Bu çalışmada yüksek düzeyde karbapenem direncinden bu enzimle birlikte ek direnç mekanizmalarının sorumlu olduğu vurgulanmıştır. Bu çeşitli mutasyonların ve *oprD* geninde 88 nükleotidin delesyonunun gözlenmesiyle temellendirilmiştir. Bu çalışma; Sevillano ve ark.'nın *A. baumannii*'de bulunan ve plazmid üzerinde taşınan bir OXA-40 enziminin iki *P. aeruginosa* suşunda izole edilmesinden sonra *P. aeruginosa*'daki karbapenem hidrolize eden sınıf D beta laktamazların ikinci tanımlanması olarak belirtilmiştir.

OXA-198 *Chlorobi* filumundan yeşil sülfür bakterilerinin bir üyesi olan *Chlorobaculum parvum*'un doğal beta laktamazları ile %83 aminoasit sekans benzerliği göstermektedir. Sınıf 1 integron üzerinde kodlu olan ve *Pseudomonas* ya da Gram (-) bakterilere kolayca transfer edilebilen bir plazmid tarafından taşınan bu beta laktamazın *P. aeruginosa* tarafından kazanılması, sınıf D beta laktamazların yayılmasına yol açabilir. Dahası bu integronun VIM-1 geni pozitif bir *P. aeruginosa* suşunda bulunan, transpozon ile

taşınan genle de çok benzer olduğu ve kolaylıkla konjugatif plazmidlere aktarılabileceği belirtilmiştir (Garch 2011).

Şekil 5.1: Sınıf D beta-laktamazların temsilcilerinin dendrogramı (Garch 2011).



Lee ve ark.'nın (2013) yaptıkları bir çalışmada; yöntem olarak OXA karbapenemaz tespitinde rutin bir yöntem olan multipleks PZR yerine MALDI-TOF MS (Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass) yöntemi kullanılarak karbapenem dirençli 60 *Acinetobacter* spp. ve 9 *P. aeruginosa* suşunda çeşitli karbapenemazlarla birlikte KHO grubundan OXA-23 ve OXA-51 karbapenemazları araştırılmıştır. *Acinetobacter* suşlarının 20 tanesinde OXA-23 pozitifliği saptanırken, 6 tanesinde ISAbal ilişkili OXA-51 geni bulunmuş, araştırılan 9 *Pseudomonas* suşunda ise OXA karbapenemazlara rastlanmamıştır. Kullanılan yöntemin farklı olmasının yanı sıra, bu çalışmada örnek sayısının 9 gibi çok küçük bir değer olması OXA karbapenemaz tespit edilememeye sebebi olabilir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

*Pseudomonas* kökenlerinde tüm dünyada olduğu gibi ülke genelinde yüksek oranda antimikrobiyal direnç ve çoğul direnç özellikleri görülmektedir. Bu direnç mekanizmalarının bilinmesi ve yayılımının önlenmesi önemlidir.

Bu genlerin *Pseudomonas*'larda var olup olmadığı, varsa karbapenem direnciyle ilişkisi hakkında neredeyse çok az bilimsel veri vardır. Bizim çalışmamız bu yönde bilimsel verilere önemli katkı sağlayacaktır. Çalışmada bulduğumuz pozitiflikler bu genlerin *Pseudomonas*'larda varlığını göstermekle birlikte, karbapenem direnciyle ilişkisini yorumlamakta güçlük vardır.

*Pseudomonas*'larda bu OXA enzimleri direkt karbapenem direncine yol açabileceği gibi diğer direnç mekanizmalarıyla birlikte karbapenem direncinde en azından sinerjik rol oynamış olabilir. Bu konuda yapılacak benzer çalışmalarla bu ilişkiye dair veriler artırılmalıdır.

Sonuç olarak; dünya genelinde artış göstermekte olan karbapenem dirençli *Pseudomonas* suşlarının, özellikle yoğun bakım üniteleri başta olmak üzere ülkemizde de artış gösterdiği gözlenmektedir. Bu etkenlerin neden olduğu infeksiyonların tedavisindeki zorluklar, akılcı antibiyotik kullanımının önemini ve karbapenem türü antibiyotiklerin gerekli olduğu durumların doğru seçilmesini daha önemli kılmaktadır. Aktarılabılır enzimatik direnç genleri aracılığıyla bu direnç biçimlerinin hızla yayılması, hastane epidemilerine yol açması uzak bir olasılık değildir. Bu enzimlerin taşınabilir elemanlar üzerinde bulunması, bunların yayılımı ile ilgili kaygıları artırmaktadır. Bu yüzden direnç mekanizmalarının tümüyle aydınlatılması, alınacak önlemler açısından önem arz etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

- Afzal-Shah M, Woodford N, Livermore DM. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27 molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45(2):583-8. doi.org/10.1128/AAC.45.2.583-588.2001.
- Akalın H. *Pseudomonas* İnfeksiyonları. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve Özet kitabı, İstanbul; 2004:124-30
- Aktas Z, Kayacan CB, Schneider I, Can B, Midilli K, Bauernfeind A. Carbapenem hydrolyzing oxacillinase, OXA-48, persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. *Chemotherapy* 2008;54:101-6.
- Aktas Z. Direnç mekanizmaları ve direnç belirleme yöntemleri. *ANKEM derg.* 2012;26 (Ek 2):278-82
- Aksaray S, Dokuzoğuz B, Günever E, Yücesoy M, et al. Surveillance of antimicrobial resistance among Gram-negative isolates from intensive care units in eight hospitals in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2000;45:695-9.
- Aloush V, Navon-Venezia S, Seigman-Igra Y, Cabili S, Carmeli Y: Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and clinical impact, *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):43-8.
- Arabacı F, Oldacay M. Yoğun bakım servisinde yatan hastalardan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve Metallo-Beta-Laktamaz oranlarının araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 2010;40(1):37-40.
- Arman D ve Uçan E.S. Hastane kökenli pnömonide antibiyotik tedavisi. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004;1:61-71.
- Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE, Anđ Ö. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarında plazmidik sefamisinaz CMY 2. *İnfeks Derg.* 1995;9(1-2):67-9.
- Bassetti M, Nicolini L, Esposito S, Righi E, Viscoli C. Current status of newer carbapenems. *Curr Med Chem.* 2009;16:564-75.
- Baştürk S. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii* suşlarında çeşitli kinolon grubu antibiyotiklerin duyarlılıklarının araştırılması. İstanbul: Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık tezi. 2005.
- Bilgehan H. Non-fermantatif Gram olumsuz basiller. In: Özel Bakteriyoloji ve Bakteri İnfeksiyonları, İzmir: Fakülteler Kitabevi, 2000:176-88.
- Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs.* 2002;11(4):529-44.
- Bonnet R, Marchandin H, Chanal C et al. Chromosome-encoded class D  $\beta$ -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46:2004-6.
- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbial Rev.* 2001;14:933-51.

- Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11:15-23.
- Brown S, Amyes S. OXA beta-lactamases in *Acinetobacter*: the story so far, *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(1):1-3.
- Budak S, Aktaş Z, Erdem H. Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvar dan Kliniğe Karbapenemazlar 2012. URL: <http://www.mjima.org/>. Son erişim: 10.02.2014.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1211-33.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54:969-76.
- Büyüktuna S.A, Turhan Ö, Cengiz M, Ramazanoğlu A, Yalçın A.N. Nosocomial Infections and Agents Determined by Consultations in Intensive Care Unit. *Trakya Univ Tıp Fak Derg* 2010;27(2):150-155. doi: 10.5174/tutfd.2008.01343.1
- Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotics resistance. *Clin Microbial Infect*. 2000;6(Suppl 3):93-94.
- Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:381-93.
- Cunha B A. Antibiotic resistance. *Antibiotic therapy, Part I. Medical Clinics of North America*. 2000;84:1407- 29.
- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement. CLSI Document M100-S23. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2013.
- Çiftci İ.H, Aşık G. *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM Derg*. 2011;25(3):196-207. doi: 10. 5222/ankem. 2011. 196
- Da Silva GJ, Quinteira S, Bértolo E et al. Long-term dissemination of an OXA-40 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* clone in the Iberian Peninsula, *J Antimicrob Chemother*. 2004;54(1):255-8. doi.org/10.1093/jac/dkh269 PMID:15190040
- Defez C, Fabbro-Peray P, Bouziges N et al: Risk factors for multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* nosocomial infection, *J Hosp Infect*. 2004;57(3):209-16.
- Delden CV and Iglewski B. Cell to Cell Signaling and *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *Emerging Infectious Diseases*. 1998;Vol:4:551-60.
- Demirdağ K, Cabalak M, Özgüler M. Yoğun bakımda izole edilen *Pseudomonas spp.* suşlarında metallo-beta-laktamaz sıklığının araştırılması. *ANKEM Derg*. 2011;25(3):150-6.
- Durupınar B. Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klimik Dergisi*. 2001;14:47-56.
- Dündar D, Tamer G.S. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antimikrobiyal direnci: Üç yıllık değerlendirme. *ANKEM Derg*. 2009;23(1):17-21.
- Eldere JV. Multicentre surveillance of *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility patterns in nosocomial infections. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51:347-52.

- Erdem B. Pseudomonaslar, "Ustaçelebi Ş. (ed):Temel ve Klinik Mikrobiyoloji" kitabı, Gündeş Kitapevi, Ankara; 1999:551-7.
- Ertürk A, Çiçek A.Ç, Köksal E, Köksal Z.Ş, Özyurt S. Yoğun bakım ünitesinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıkları. ANKEM Derg 2012;26(1):1-9
- Essack SY. The development of  $\beta$ -lactam antibiotics in response to the evolution of  $\beta$ -lactamases. Pharm Res. 2001;18:1391-9
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet).
- Falagas ME, Koletsi PK, Kopterides P, Michalopoulos A: Risk factors for isolation of strains susceptible only to polymyxin among patients with *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia, Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(7):2541-3.
- Fidan I, Gürelık FÇ, Yüksel S, Sultan N. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. Ankem Derg. 2005;19:68-70.
- Figueiredo S, Bonnin RA, Poirel L, Duranteau J, Nordmann P. Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*, Clin Microbiol Infect. 2012;18:907-13. doi: 10.1111/j. 1469-0691. 2011. 03708.
- Forbes BA, Sahm DF, Weissfeld AS. *Pseudomonas*, *Burkholderia*, and similar organisms. Bailey/Scott's Diagnostic Microbiology. Mosby. 2002;11:385-98.
- Fritshe TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo-beta-lactamase-mediated resistances: A summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. Clin Infect Dis. 2005;41:276-8.
- Garch F.E, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Class D Beta-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Oct;55(10):4828-33. doi: 10. 1128/AAC. 00522-11
- Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections. Am J Infect Control. 1988;16:128-40.
- Girlich D, Naas T, Nordmann P. Biochemical characterization of the naturally occurring oxacillinase OXA-50 of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2004;48:2043-8.
- Goozner M. From The 800 Million Pill –Me Too! MedGenMed. 2004;6(2):57
- Gökmen T, Güran M, Benk G, Kızılyıldırım S, Köksal F. Yanık ünitesinde kısa-dönem/uzun-dönem *Acinetobacter baumannii* salgını. ANKEM Derg. 2012;26(3):120-5. doi: 10. 5222/ankem. 2012. 120
- Gönüllü N, Gürol Y, Bülüç M, Bal Ç. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında görülen beta-laktam direnç fenotipleri ve antibiyotik duyarlılıkları. Hastane İnfek Derg. 2003;7:141-7.
- Gunn BA, Kiser JF, Almazon RD. Culture Media, test and Reagents in Bacterology. In: Howard BJ, Klass J. Clinical and pathogenetic microbiology. The CV mostry Company, St. Louis; 1987:849-905.

- Güçlü A.Ü. Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen klinik *Acinetobacter baumannii* izolatlarında beta-laktamazların moleküler analizi. Ankara: Ortadoğu Teknik Üniversitesi; doktora tezi 2011.
- Gülmez D, Gür D, Haşçelik G and EARRS Türkiye Çalışma Grubu. EARSS Türkiye verileri: 2009 Yılı, 1. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi Kitabı. Antalya; 2011.
- Gür D. Hastane infeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. *Hastane İnfek Derg.* 2003;7(3):111-7
- Gür D. Gram-negatif bakterilerde antibakteriyel direnç mekanizmaları. In: Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları, Birinci Baskı Editör(ler): Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004. s: 69-83.
- Gür D, Korten V, Ünal S, Deshpande LM, Castanheira M. Increasing carbapenem resistance due to the clonal dissemination of oxacillinase (OXA-23 and OXA-58)-producing *Acinetobacter baumannii*: report from the Turkish SENTRY program sites. *J Med Microbiol.* 2008;57:1529-32.
- Gülay Z. Antimikrobiyal ilaçlara direnç " Ustaçelebi Ş. (ed) : Temel ve Klinik Mikrobiyoloji " kitabı, Güneş Kitapevi, Ankara,1999:91-101.
- Gülay Z. Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. İzmir Güven Kitabevi; 2003:87-93.
- Helfand S and Bonomo R. Current challenges in antimicrobial chemotherapy: The impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and metallo- $\beta$ -lactamases on the treatment of resistant Gram- negative pathogens. *Curr Opin Pharmacol* 2005;5:452-8.
- Higgins P.G, Perez-Llarena F.J, Zander E, Fernández A, Bou G, Seifert H. OXA-235, a novel class D beta-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2121-6. doi: 10.1128/AAC.02413-12.
- Irfan S, Turton J.F, Mehraj J, Siddiqui S.Z , Haider S, Zafar A, Memon B, Afzal O, Hasan R. Molecular and epidemiological characterisation of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from public and private sector intensive care units in Karachi, Pakistan. *J Hosp Infect.* 2011Jun;78(2):143-8. doi:10.1016/j.jhin.2011.01.029.
- Kayse F. H., Bienz K. A., Eckert J. Tıbbi Mikrobiyoloji. Çev: Küçüker M. A., Tümbay E., Anđ Ö. : Pseudomonadaceae., Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; 1997:8;230.
- Karunasagar A, Maiti B, Shekar M, Shenoy M.S and Karunasagar I. Prevalence of OXA-type carbapenemase genes and genetic heterogeneity in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. from Mangalore, India. *Microbiol Immunol.* 2011;55:239-46. doi:10.1111/j.1348-0421.2011.00313.x
- Kıska DL. and Gilligan PH. *Pseudomonas*. Manual of Clinical Microbiology. Eight Ed., In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC. ASM press; 2003:719-28.
- Koneman E, Stephan DA, William MJ, Schreckenberger PC, Winn CW Jr. The nonfermentative Gram-negative bacilli. Konoman's Colour Atlas and 55 Textbook of Diagnostic Microbiology 6th Ed. Philadelphia: Lippincott; 2006:303-91.
- Kunz AN, Brook I. Emerging resistant Gram negative aerobic bacilli in hospital acquired infections. *Chemotherapy.* 2010;56:492-500.

- Lawrence C. Book review: Medicine and victory: British military medicine in the second World War. *Medical History*. 2005;49(3):372-3
- Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. *Bilimsel Tıp Yayınevi* 2008;307-21
- Leblebicioğlu H, Günaydın M, Esen S, Tuncer I, Fındık D, Ural O, Saltoslu N, Yaman A, Taşova Y. Surveillance of antimicrobial resistance in Gram-negative isolates from intensive care units in Turkey: analysis of data from the last 5 years. *J. of Chemother.* 2002;14:140-6.
- Lee W, Chung H, Lee Y, Yong D, Jeong S.E, Lee K, Chong Y. Comparison of matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight mass spectrometry assay with conventional methods for detection of IMP-6, VIM-2, NDM-1, SIM-1, KPC-1, OXA-23, and OXA-51 carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov;77(3):227-30. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2013.07.005.
- Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting. *Curr Opin Microbiol*. 2000;3:489-95
- Livermore DM. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *J Antimicrob Chemother*. 2001;47:247-50.
- Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006;14:413-20.
- Lolans K, Rice T.W, Munoz-Price L.S, Quinn J.P. Multicity outbreak of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Sep;50(9):2941-5.
- Mandell GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000;264-72.
- Mansur A, Ay S, Otlu B, Güçlüer N, Ersoy Y. Karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında metallo beta laktamaz üretiminin araştırılması. *J Turgut Ozal Med Cent* 2013;20(3):237-42
- Michael JJ, Abbott SL. Bacterial identification for publication: When Is Enough Enough? *J. Clin Microbiol* 2002;40:1887-91.
- Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Canton R. Acquired carbapenemases in Gram negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. *Clin Microbiol Infect*. 2010;16:112-22.
- Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Klinik mikrobiyoloji* 9.baskı; 2007;48:734-48.
- Naas T, Nordmann P. OXA-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des*. 1999;5:865-79.
- Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 May 30;103(22):8305–6.
- Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321-31

- Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009;9:228-36.
- Ozen, N., Ergani, A., Naas, T., et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the carbapenemase OXA-58 in Turkey. *Open Antimicrob. Agents J*. 2009;1:1-8.
- Özdemir M, Erayman İ, Türkdäği H, Baykan M, Baysal B. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg*. 2009;23(3):122-6.
- Özsüt H ve Gün H. Yoğun bakım ünitesinde infeksiyon sorunu: Dirençli bakteriler ve antibiyotik kullanımı. *Hastane İnfek Derg*. 1998;1:5-14.
- Öztürk R. Çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* ile oluşan infeksiyon hastalıklarında antimikrobik tedavi, *ANKEM Derg*. 2008;22(Ek 2):36-43.
- Özgüven V, Dizer U. " Monobaktam ve Karbapenemler " Topçu A.W, Söyletir G, Doğanay M.eds: *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi " kitabı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul;2002:202-14.*
- Öztürk C.E, Çalışkan E, Şahin İ. *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında antibiyotik direnci ve metallo-beta-laktamaz sıklığı. *ANKEM Derg*. 2011;25(1):42-7.
- Paköz N.İ.E, Doğan S.Ş, Aral M. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları. *ANKEM Derg*. 2011;25(2):73-8.
- Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG. ARI-1: Beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*, *Int J Antimicrob Agents*. 1993;2(2):81-7.
- Patricia A. Bradford, Phd. What's new in  $\beta$ -lactamases? *Curr Infect Dis Rep*. 2001 Feb;3(1):13-9.
- Pechere JC, Köhler T. Patterns and modes of  $\beta$ -lactam resistance in *P. aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect*. 1999;5(suppl 1):15-8.
- Peleg A.Y, Seifert H, Paterson D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin. Microbiol. Rev*. 2008;21:538-82.
- Pier GB, Ramphal R: *Pseudomonas aeruginosa*, "Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds): *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 6. baskı" kitabında s. 2587-615, Philadelphia: Churchill Livingstone; 2005.
- Pitt TL. *Pseudomonas*, *Burkholderia* and related genera. In: Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, Ninth Ed, Eds, Collier L, Balows A, Susman M. London, Oxford University Press.1998.
- Poirel L, Nordmann P. Acquired carbapenem hydrolyzing beta-lactamases and their genetic support. *Curr Pharm Biotechnol*. 2002;3:117-27.
- Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo- $\beta$  -lactamases gene bla *spm-1* surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Apr;48(4): 1406-9.
- Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin Microbiol Infect*. 2006;12:826-36. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2006.01456.x

- Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol.* 2007;2:501-12
- Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010;54:24–38.
- Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Principles and Practise of Infectious Diseases*, Fifth Ed. 2000. Eds, Mandell GR, Bennett JE, Dolin R. New York, Chur chill-Livingstone Inc. ; 2310-35.
- Quinn JP. Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram negative pathogens. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):117-24.
- Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007;20:440-58.
- Rasmussen B A, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:223-32.
- Rice LB, Sahm D, Bonomo RA. Mechanisms of resistance to antimicrobial agents, “Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RC (eds): *Manual of Clinical Microbiology*” ASM Press, Washington, DC, 2003.p.1074-101.
- Rodriguez-Martinez JM, Poirel L, Nordmann P. Extended spectrum cephalosporinases in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53:1766-71.
- Saçar S, Kavas S.T, Asan A, Cevahir N, Serin S, Turgut H. Pamukkale üniversitesi hastanesi'nde hastane infeksiyonları sürveyansı: üç yıllık analiz. *Turkish Journal of Infection* 2008;22(1):15-21
- Sarı A.N, Biçmen M, Gülay Z. The First Report on the Outbreak of OXA-24/40-Like Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. *Jpn. J. Infect. Dis.* 2013;66:439-42.
- Schweizer HP. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Gen Mol Res.* 2003;2: 48-62,.
- Sevillano E, Gallego L, García-Lobo J.M. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. *Pathologie Biologie.* 2009;57:493-5. doi:10.1016/j.patbio.2008.05.002
- Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance, *J Med Microbiol.* 2009;58:1133-48.
- Topçu A.W., Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri 3. baskı, Cilt 1. 2008:219-450.
- Toleman A M, Rolston K, Jones N, Walsh RT. Molecular and biochemical characterization of OXA-45, an extended- spectrum class 2d  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Sep;47(9):2859-63.
- Turgut H, Turhanoglu M, Çetin ÇB, Yalçın AN. Hastane infeksiyonu etkeni *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının bazı antibiyotiklere direnci. *İnfek Derg.* 2002;16:63-6.
- Tünger A, Çavuşoğlu C, Korkmaz M. *Asya Mikrobiyoloji*. Asya Tıp Yayıncılık 2. baskı. 2003:11- 41.
- Usluer G. Çoklu dirençli patojenler: Epidemiyoloji ve kontrol. *Flora.* 2002;7:135-141.



- Jones RN, Sader HS, Beach ML. Contemporary in vitro spectrum of activity summary for antimicrobial agents tested against 18569 strains non-fermentative Gram-negative bacilli isolated in SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2001). *Inter J Antimicrob Agents*. 2003;22:551-6.
- Vahaboğlu H. Çoğul dirençli non-fermentatif Gram-negatif basiller. *Hastane İnfek Derg*. 2000;4:222-5.
- 
- Vranić-Ladavac M, Bedenić B, Minandri F, Ištok M, Bošnjak Z, Frančula-Zaninović S, Ladavac R, Visca P. Carbapenem resistance and acquired class D beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii* from Croatia 2009–2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013 Nov 6. DOI: 10.1007/s10096-013-1991-9
- Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21:367-71.
- Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36: 8-14.
- Walther-Rasmussen J, Hoiby N. OXA-type carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57:373-83.
- Weinstein, R.A., Hayden, M.K., Multiply drug-resistant pathogens: Epidemiology and control, in *Hospital Infections*, edited by J.V. Bennet, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia; 1998,215-36.
- Williams P. Quorum sensing: an emerging target for antibacterial chemotherapy? *Expert Opin Ther Targets*. 2002 Jun;6(3):257–74.
- Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. The Nonfermentative Gram-Negative Bacilli*. Lippincott Williams and Wilkins. Sixth Edition, 2006; 309-75.
- Woodford N, Ellington MJ, Coelho JM et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp., *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(4):351-3.
- Yüce A.: Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *KLİMİK Dergisi*, 2001;41-46.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151-61.

