

**T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GRAM NEGATİF NON FERMENTATİF BAKTERİLERDE  
METALLO-BETA-LAKTAMAZ ENZİMİNİN FARKLI  
YÖNTEMLERLE GÖSTERİLMESİ VE BU YÖNTEMLERİN  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**UZMANLIK TEZİ  
Dr. Hatice ÇAĞLAR**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Yasemin BULUT**

**ELAZIĞ  
2012**

**DEKANLIK ONAYI**

**Prof. Dr. İrfan ORHAN**

**DEKAN**

Bu tez uzmanlık tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. Mustafa YILMAZ**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

**Doç. Dr. Yasemin BULUT** \_\_\_\_\_

**Danışman**

**Uzmanlık Tezi Değerlendirme Jüri Üyeleri**

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

..... \_\_\_\_\_

*Sevgili babama ithafen...*

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca bilgi ve birikimiyle yardımlarını esirgemeyen, sabırla destekleyen değerli hocam, tez danışmanım Doç.Dr Yasemin BULUT'a ve emeğini, bilgisini ve desteğini sonuna kadar benden esirgemeyen sevgili Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca uzmanlık eğitimim sırasında yetişmemde önemli katkıları olan bilgi ve deneyim kazanmama olanak sağlayan değerli hocalarım; Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN, Prof. Dr. Adnan SEYREK, Prof. Dr. Handan AKBULUT ve Prof. Dr. Ahmet KİZİRGİL'e teşekkür ederim.

Bir aile gibi olduğum araştırma görevlisi arkadaşlarıma, Dr. Nuray Arı ve ailesine, laboratuvarda beraber çalıştığım teknisyen arkadaşlarıma ve Mustafa Şeker'e bana destek oldukları için teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde desteklerini, sevgilerini, dualarını esirgemeyen, benimle ağlayıp benimle gülen, başarı ya da başarısızlığımda hep yanımda olan, kendileriyle gurur ve onur duyduğum çok değerli anne ve babama ve hayatıma renk katan abilerime, biricik ablama en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Son olarak hayatımın yegane armağanı, en iyi dostum, çok sevgili eşim ve hayat arkadaşım J. Kd. Ütğm. Mehmet Emin ÇAĞLAR'a sonsuz teşekkürler.

Dr. Hatice ÇAĞLAR

## ÖZET

Non fermentatif Gram negatif (NFGN) basillerin son yıllarda giderek artan karbapenem direncinden sorumlu olabilecek yeni metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimleri tanımlanmakta ve sayıları artarak dünya genelinde yayılma göstermektedir. Bu çalışmada, imipenem ve meropenem dirençli klinik izolatlarda MBL üretiminin yerini araştırmak ve ayrıca bu enzimlerin varlığını ortaya koyabilecek fenotipik yöntemleri test etmek ve karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmaya alınan bakterilerin tanımlanması standart klinik mikrobiyolojik yöntemlerle yapılmış ve BD Phoenix tam otomatize identifikasyon sisteminde değerlendirilmiştir. Bakterilerin invitro koşullarda antibiyotiklere direnç durumları CLSI önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiş, BD Phoenix tam otomatize identifikasyon cihazı ile doğrulanmıştır. MBL üretimi kombine disk yöntemi, çift disk sinerji, modifiye Hodge testi ve E test yöntemleri ile araştırılmıştır.

Meropenem dirençli *Acinetobacter* kökenlerinde MBL üretimi kombine disk metodu ile % 95, MP-EDTA çift disk sinerji testi ile % 67.5, modifiye Hodge testi ile % 72.5, E test ile % 97.5; meropeneme dirençli *Pseudomonas* kökenlerinde kombine disk metodu ile %80, MP-EDTA çift disk sinerji testi ile % 100, Modifiye Hodge testi ile % 60 ve E test ile % 60 oranında bulunmuştur.

Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerin aztreonam ve colistin dışında tüm beta laktamlara dirençli olmaları ve klinik uygulamada uygun bir MBL inhibitörünün bulunmaması, ayrıca MBL ile aminoglikozid direnç genlerinin genetik olarak birarada bulunması epidemiyolojik açıdan MBL varlığının tespit edilmesini çok önemli kılmaktadır. MBL araştırılmasında hızlı, basit, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek olan iyi bir fenotipik tarama yöntemine gerek vardır.

Günümüzde var olan tarama yöntemlerinin hiçbiri yeterli değildir. Bu sebeple tarama sonuçlarının moleküler yöntemlerle doğrulanması gereklidir. Yaptığımız çalışma sonunda, hastanemizde MBL üreten suşların belirlenmesi ve kontrolü ile ilgili olarak daha ileri araştırmaların yapılması gerektiği düşüncesi ortaya çıkmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** MBL üretimi, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, fenotipik yöntemler.

## ABSTRACT

### **THE DETECTION OF METALLO-BETA-LAKTAMAZ (MBL) ENZYME IN GRAM NEGATIVE NON FERMANTATIVE BACTERIA BY DIFFERENT METHODS AND THE COMPARISON OF THESE METHODS**

New metallo-beta-lactamase (MBL) enzymes are identified in recent years that may be responsible for the increased number of non fermentative Gram negative (NFGN) bacilli's growing carbapenem resistance and they spread throughout the world. In this study, we aimed to investigate the production of MBL at clinical isolates resistant to imipenem and meropenem, to test and compare phenotypic methods that reveals the presence of these enzymes.

The identification of bacteria was made with standard clinical microbiological methods and confirmed in the BD Phoenix fully automatic identification system. In vitro bacteria resistance to antibiotics determined by using disk method in accordance with CLSI recommendations and confirmed with the BD Phoenix fully automated identification device. Production of MBL were evaluated by combined disc method, double-disk synergy test, modified Hodge test and E test methods.

Metallo-beta-lactamase production at meropenem resistant *Acinetobacter* strains were found 95% with the combined disc method, 67.5% with MP-EDTA double-disk synergy test, 72.5% with the modified Hodge test and 97.5% with E test; at meropenem resistant *Pseudomonas* strains 80% with the combined disk method, 100% with MP-EDTA double-disk synergy test, the modified Hodge test and the E test with 60% and 50% respectively.

Metallo-beta-lactamase producing bacteria are being resistant to all beta lactams except aztreonam and colistin, in clinical practice the lack of a suitable inhibitor for MBL, as well as presence of MBL genes together with the aminoglycoside resistance genes in genetic with epidemiologic aspect makes it very important to determine the presence of MBL.

For the investigation of MBL a fast, simple, with high sensitivity and specificity good phenotypic screening method is needed. None of the screening methods at present are sufficient. Therefore, the molecular methods are needed to

confirm the screening results. Our study suggests that further research needs to be done in our hospital for identification and control of MBL producing strains.

**Keywords:** MBL production, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, phenotypic methods.

## İÇİNDEKİLER

<b>BAŞLIK SAYFASI</b>	<b>i</b>
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>ii</b>
<b>İTHAF</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>viii</b>
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b>	<b>xi</b>
<b>TABLO LİSTESİ</b>	<b>xii</b>
<b>KISALTMALAR LİSTESİ</b>	<b>xiii</b>
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Non Fermentatif Gram Negatif Bakteriler	2
1.1.1. Acinetobacter baumannii	3
1.1.2. Pseudomonas aeruginosa	4
1.2. Beta Laktam Antibiyotikler	7
1.2.1. Penisilinler	8
1.2.1.1. Doğal penisilinler	8
1.2.1.2. Penisilinaza dayanıklı penisilinler	8
1.2.1.3. Aminopenisilinler:	8
1.2.1.4. <i>Pseudomonas</i> 'lara etkili penisilinler:	8
1.2.1.5. Geniş spektrumlu <i>Pseudomonas</i> 'lara etkili penisilinlere:	8
1.2.1.6. Amdinopenisilinler:	8
1.2.1.7. Beta laktam inhibitörlü kombine penisilinler:	8
1.2.2. Sefalosporinler	9
1.2.2.1. 1.kuşak sefalosporinler	10
1.2.2.2. 2. kuşak sefalosporinler	10
1.2.2.3. 3. kuşak sefalosporinler	10
1.2.2.4. 4. kuşak sefalosporinler	10
1.2.2.5. 5.kuşak sefalosporinler	10
1.2.3. Monobaktamlar	11
1.2.4. Karbapenemler	11



1.2.4.1. İmipenem	12
1.2.4.1.3. Farmakokinetik ve farmakodinamik	14
1.2.4.2. Meropenem	14
1.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları	15
1.3.1. Kromozomal genlerde mutasyon oluşması	15
1.3.2. Direnç genlerinin dışarıdan alınması	15
1.3.3. Dışarıdan alınan genlerde mutasyon oluşması	16
1.3.4. İlacın hedef bölgesinde gelişen değişiklikler	16
1.3.5. Dış membran geçirgenliğinin bozulması	17
1.3.6. Beta laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi	18
1.4. Beta laktamazlar	18
1.4. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları	24
1.4.1. İlacın hücre içinde etkin konsantrasyona ulaşamaması	24
1.4.1.1. Porin değişimleri	24
1.4.1.2. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi	24
1.4.2. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı	24
1.4.2.1. Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenemazlar	24
1.4.2.2. İntrinsik (kromozomal) karbapenemazlar	25
1.4.3. Hedef PBP değişimleri	25
1.5. Metallo-Beta-Laktamazlar	25
1.5.1. Metallo-beta-laktamazların biyokimyası	26
1.5.2. Kromozomal olarak kodlanmış MBL'lar	27
1.5.3. MBL'ların aktarılmasında kullanılan genetik araçlar	28
1.5.4. Aktarılabılır MBL'ler	29
1.5.4.1. IMP tipi metallo-beta-laktamazlar	29
1.5.4.2. VIM-tip metallo-beta-laktamazlar	31
1.5.4.3. SPM-1 metallo-beta-laktamaz	33
1.5.4.4. GIM-1 metallo-beta-laktamaz	33
1.5.5. Deneysel metallo-beta-laktamaz enzim inhibitörleri	34
1.6. MBL'ların Tespiti	35
1.6.1. Kombine disk sinerji testi	35
1.6.3. MBL E Test yöntemi	36

1.6.4. Modifiye Hodge testi:	36
1.6.5. Mikrodilüsyon test	36
1.6.6. Moleküler yöntemler	37
1.7. MBL Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerle Oluşan İnfeksiyonların Tedavisi	37
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>40</b>
2.1. Çalışmada kullanılan bakteriler	40
2.2. Antibiyotik diskleri	40
2.3. Mueller-Hinton agar besiyeri	40
2.4. EDTA (Etilendiamintetraasetik asit ) Hazırlanışı	40
2.5. MBL E Test stripleri	41
2.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	41
2.7. MBL Tesbitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler	41
2.7.1. Kombine Disk Testi	41
2.7.2. Çift Disk Sinerji Testi	42
2.7.3. Modifiye Hodge Testi	42
2.7.4. MBL E Test	43
<b>3. BULGULAR</b>	<b>44</b>
3.1. Metallo-Beta-Laktamaz Tayininde Kullanılan Fenotipik Testler	47
3.1.1. Çift Disk Sinerji Testi	47
3.1.2. Kombine disk sinerji testi (KDST)	48
3.1.3. Modifiye Hodge testi	49
3.1.4. MBL E test	50
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>52</b>
<b>5. KAYNAKLAR</b>	<b>61</b>
<b>6. ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>78</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b> Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'daki MBL pozitifliği	45
<b>Şekil 2.</b> Çift disk sinerji testinde pozitiflik	47
<b>Şekil 3.</b> Çift disk sinerji testinde negatiflik	47
<b>Şekil 4.</b> Kombine disk sinerji testinde pozitiflik	48
<b>Şekil 5.</b> Kombine disk sinerji testinde negatiflik	48
<b>Şekil 6.</b> Modifiye Hodge testinde pozitiflik	49
<b>Şekil 7.</b> Modifiye Hodge testinde negatiflik	50
<b>Şekil 8.</b> E Test pozitiflik	50
<b>Şekil 9.</b> E Test negatif	51

## TABLO LİSTESİ

<b>Tablo 1.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın virulans faktörleri ve biyolojik etkileri	5
<b>Tablo 2.</b> Doripenem, ertapenem, imipenem ve meropenemin <i>Enterobacteriaceae</i> ve non fermentatif GN bakteriler için MİK değerleri.	12
<b>Tablo 3.</b> Beta laktamaz grupları ve genel özellikleri	20
<b>Tablo 4.</b> IMP tipi metallo-beta-laktamazlar	30
<b>Tablo 5.</b> VIM tipi beta laktamazlar	33
<b>Tablo 6.</b> MBL üreten izolatların olası tedavi seçenekleri	38
<b>Tablo 7.</b> Örneklerin servislere göre dağılımı	44
<b>Tablo 8.</b> <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'nın bazı antibiyotiklere direnç oranları	44
<b>Tablo 9.</b> Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda <i>A. baumannii</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'daki MBL pozitifliği	45
<b>Tablo 10.</b> Tüm fenotipik testlerin <i>A. baumannii</i> için karşılaştırılması	46
<b>Tablo 11.</b> Tüm fenotipik testlerin <i>P. aeruginosa</i> için karşılaştırılması	46
<b>Tablo 12.</b> Çift disk sinerji testi ile diğer fenotipik yöntemlerin uyum oranları	48
<b>Tablo 13.</b> Kombine disk sinerji testi ile diğer fenotipik yöntemlerin uyum oranı	49

## KISALTMALAR LİSTESİ

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>CLSI</b>	: The Clinical and Laboratory Standards Institute
<b>ÇDST</b>	: Çift disk sinerji testi
<b>DHP-1</b>	: Dehidropeptidaz-1
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetik asit
<b>EF2</b>	: Elongasyon faktör 2
<b>ESBL</b>	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
<b>GIM</b>	: German imipenemase
<b>GN</b>	: Gram negatif
<b>IMP</b>	: İmipenemase
<b>İMP</b>	: İmipenem
<b>Kb</b>	: Kilo baz çifti
<b>KDST</b>	: Kombine disk sinerji testi
<b>MBL</b>	: Metallo-beta-laktamaz
<b>MHT</b>	: Modifiye Hodge testi
<b>MİK</b>	: Minimum inhibitör konsantrasyon
<b>MP</b>	: Meropenem
<b>MPA</b>	: 2-merkaptopropionik asit
<b>NaCl</b>	: Sodyum klorür
<b>NaOH</b>	: Sodyum hidroksit
<b>NFGN</b>	: Non fermentatif Gram negatif
<b>OMP</b>	: Outer membran protein
<b>PBP</b>	: Penisilin bağlayan protein
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>SIM</b>	: Seoul imipenemase
<b>SPM</b>	: Sao Paulo imipenemase
<b>VIM</b>	: Verona imipenemase
<b>Zn</b>	: Çinko
<b>µl</b>	: Mikrolitre

## 1. GİRİŞ

Bakterilerin ürettiği beta laktamaz enzimleri beta laktam antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinden sorumlu mekanizmalar içinde en önemlisidir. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (ESBL) ve plazmidlerle taşınan AmpC beta laktamazlar son 25 yılda ortaya çıkmış ve sayıları giderek artmıştır. Bu beta laktamazların hidrolizine karşı stabil olmaları sebebiyle karbapenemler, dirençli Gram negatif (GN) bakterilerin yol açtığı infeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek olmuştur. Maalesef son yıllarda karbapenemlere karşı da, özellikle non fermentatif Gram negatif (NFGN) basiller arasında, artan bir direnç sorunu ortaya çıkmaya başlamış ve yapılan son çalışmalara göre bu direnç sorunu korkunç boyutlara ulaşmıştır.

İmmun sistemi baskılanmış ve hastanede yatan hastalarda ciddi infeksiyonlara neden olan NFGN bakteriler, genellikle doğada saprofit olarak bulunan bakterilerdir. İnsanda hastalık etkeni olarak en sık izole edilenleri ise *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*)'dir. Bu bakterilerin yaptığı infeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklere karşı oluşan yüksek antibiyogram direnci nedeniyle tedavide güçlüklerle karşılaşmaktadır.

*Pseudomonas aeruginosa*'da OprD porin kaybı meropenem duyarlılığını azaltır, imipenem direncine yol açar. Bununla birlikte pompa eflüks sistemi, imipenem hariç meropenem dahil bir çok antibiyotığın etkinliğini azaltmaktadır (1). Eflüks sistemini düzenleyen genlerdeki mutasyonlar, kromozomal AmpC beta laktamazların üretimi ile birlikte permeabiliteyi de azaltarak aditif etki gösterir ve böylece birden fazla mekanizmayla dirence sebep olur (2).

Her ne kadar azalmış dış membran geçirgenliği veya effluks pompa sistemi esas olarak Gram negatif basillerin karbapenem direncinden sorumlu tutulsa da, bunların yanında beta laktamazlar da dirençte rol alabilmektedir. Karbapenemazlar; sınıf A penisilinazlar, sınıf D oksasilinazlar ve sınıf B metallo-beta-laktamazlardan oluşurlar (3).

Metallo-beta-laktamazlar (MBL) ilk olarak 1991'de Japonya'da MBL (IMP-1) üreten bir *P. aeruginosa*'nın bildirilmesiyle direnç sahnesindeki yerlerini almışlardır. Daha sonra bu bölge başta olmak üzere çeşitli Asya ve Avrupa ülkelerinden GN basillerde, özellikle *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında, yeni

MBL'ler bildirilmiştir ve son yıllarda hızla artarak dünya çapında yayılma göstermektedir (3, 4). Karbapenem direncine yol açan bu MBL'lerdeki hızlı artış hem endişe vermekte hem de bu enzimlerin varlığını ortaya koyacak testlerin geliştirilmesi konusunda ilgi uyandırmaktadır. MBL aktivitesinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ve 2- merkaptopropionik asit (MPA) gibi metal şelatörler ile inhibe olma özelliklerinden yararlanılarak bu enzimleri erken tanıyabilecek tarama amaçlı basit fenotipik yöntemler geliştirilmiştir. Bunlar imipenemli, meropenemli veya seftazidimli EDTA veya MPA disklerini kullanan çift-disk sinerji testi, modifiye Hodge testi, seftazidim veya imipenem-meropenem EDTA kombine disk sinerji testi, MBL E test ve imipenemli EDTA kullanan mikrodilüsyon testidir.

Bu çalışmanın amacı; meropenem dirençli klinik izolatlarda MBL üretiminin yerini araştırmak ve ayrıca bu enzimlerin varlığını ortaya koyabilecek fenotipik yöntemleri test etmek ve karşılaştırmaktır.

### **1.1. Non Fermentatif Gram Negatif Bakteriler**

Son yıllarda immün sistemi baskılanmış ve özellikle ilaç tedavisi alan hastalarda NFGN bakterilerin, artan oranlarda görülen fırsatçı patojenler olarak infeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir (5). Bu bakteriler insanlarda derinin bakteriyel florasında, solunum yolu florası ve oral florada bulunabilmektedir. Çevresel olarak ise toprakta, suda, hastane ortamı florasında, kısaca doğada yaygın olarak bulunur (6). NFGN bakteriler birçok intrinsik veya kazanılmış ilaç direnci taşımaya eğilimlidirler. Bunun yanı sıra dirençli suşlarla meydana gelmiş olan infeksiyonlarda kullanıma giren yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı da bakteriyel direncin hızla artmakta olduğunu bildiren raporlar mevcuttur.

*Pseudomonas aeruginosa*, *A. baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia* (*S. maltophilia*) ve *Burkholderia cepacia* (*B. cepacia*) hastanede yatan hastalarda önemli hastane infeksiyonlarına neden olan NFGN bakterilerden özellikle dört türüdür (7). Yaptıkları önemli infeksiyonlar arasında septisemi, solunum ve genitouriner sistem infeksiyonları, intrakraniyal infeksiyonlar, endokardit, gastrointestinal sistem infeksiyonları, cerrahi alan infeksiyonu gibi birçok nozokomiyal infeksiyon tabloları

yer almaktadır. Bu infeksiyonlarda fırsatçı patojen olmalarına rağmen, toplumdan kazanılmış infeksiyonlara da neden oldukları bilinmektedir (8).

### 1.1.1. *Acinetobacter baumannii*

Yaklaşık 1-1.5µm genişliğinde, 1.5-2.5 µm boyunda Gram negatif koktur. İlk izolasyonda ve bir günlük taze kültürlerinde kokobasil formundadır. Subkültürlerinde veya penisilinli ortamda üretildiklerinde ise basil şeklinde görülür. Oksidaz testi negatif olması *Pseudomonas*'lardan ayırımı önemlidir. Mac Conkey besiyerinde genellikle ürer. Doğada yaygın olarak görülmekte ve insan deri florasında da bulunabildiğinden klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. *Acinetobacter* türleri özellikle vücudun nemli bölgelerinde sıkça bulunur. Yapılan çalışmalara göre normal sağlıklı bireylerin yaklaşık % 25'inin derilerinde *Acinetobacter* türlerini taşıdıkları gösterilmiştir (9).

Çapraz kontaminasyon ve hastane ortamının kaynak oluşturması nedeniyle hastanede izlenen hastalarda taşıyıcılık oranı daha yüksektir. Çalışmalarda özellikle salgın dönemlerinde hastanede yatan hastalarda boğaz taşıyıcılığı % 7-18 olarak bulunmuş ve trakeostomi sürüntülerinde ise % 45 oranında saptanmıştır (10).

Bağışıklık sistemi normal olanlarda virulans potansiyelleri düşük olduğundan infeksiyon oluşturma olasılığı oldukça düşüktür. Asidik pH'da ve düşük ısıda üreyebilme özellikleri yanında bilinen sitotoksin üretimi yoktur. Hücre duvarında bulunan lipopolisakkaritin endotoksijenik özelliği çok az bilinmektedir. *Acinetobacter* sepsisinin semptomlarından in vivo endotoksin üretimi sorumludur. Bazı *Acinetobacter* türlerinin dış membran reseptör proteinleri gibi sideroforları ürettikleri gösterilmiştir. Bakterinin insan vücudunda üreyebilmesi için gerekli olan demiri sağlayabilme özelliği de önemli virulans faktörlerindedir (11).

Birçok ajana karşı direncin korkunç boyutlara ulaştığı *Acinetobacter* türlerinin spesifik antibiyotiklere karşı duyarlılıkları önemli ölçüde farklılıklar gösterir. İmipenem, seftazidim, amikasin ve tüm diğer rutin test edilen antibiyotiklere dirençli *Acinetobacter* suşlarına bağlı salgınlar olmaktadır. Bu gibi durumlar için uygun tedavi yaklaşımı halen belirsizdir. Dirençli *Acinetobacter* türlerinin tedavisinde karbapenem grubu, sulbaktam, minosiklin ve kolistin en etkin antibiyotikler olarak bildirilmekte, özellikle ciddi *Acinetobacter* infeksiyonlarında ise



kombine tedaviler önerilmektedir. Bunlar arasında en sık kullanılan kombinasyon imipenem+amikasindir. Seftazidim+aminoglikozid veya florokinolon kombinasyonlarının kullanılabilceği, imipenem+siprofloksasin kombinasyonunun hem in vivo, hem de in vitro aktivitesinin olduğu gösterilmiştir. Rifampisin+kolistin kombinasyonlarının da in vitro olarak etkin olduğu bulunmuştur (11-13).

Antibiyotik duyarlılık profillerinde olabilecek bu değişkenlikler nedeniyle *Acinetobacter*'lerin etken olduğu infeksiyonların tedavisi etken olarak izole edilen suşların duyarlılık testleriyle belirlenmelidir (14).

### 1.1.2. *Pseudomonas aeruginosa*

1.5-3 µm boyunda, 0.5-0.8 µm genişliğinde olan bu bakteri Gram negatif, sporsuz, düz veya hafif kıvrık ve *Pseudomonadaceae* ailesi içindeki en patojen türdür. Çoğu izolatlar kanlı agarda beta hemolitik ve tipik yeşil metalik parlaklık oluşturur. Rutin kullanılan besiyerlerinde optimal 30-37°C'de ve hafif alkali ortamda iyi ürerler. Kirpikli ve hareketli, zorunlu aseptikler. Kültürlerde piyosyanin adı verilen çözüner fenazin pigmenti üretmesi en önemli özelliklerinden biridir. Piyosyanin ve piyoverdin pigmentlerinin bulunduğu bakteri izolatları kültür ortamında yeşil-mavi koloniler oluşturur. Piyosyanin dışında bakteri kırmızı pigmentten sorumlu piyorubin, siyah pigmentten sorumlu piyomelanin veya sarı-yeşil ya da yeşil-kahverengi renk veren piyoverdin pigmenti içerebilir. Oksidaz reaksiyonları pozitifdir. *P. aeruginosa* karbonhidratları fermente etmez. Glikoz, ksiloz gibi şekerlere oksidatif etki gösterirken, maltozu etkilemez.

*Pseudomonas aeruginosa*'nın epitel hücrelerine tutunmayı sağlayan piluslar ve tutunucu hücre yüzeyi yapıları olmak üzere iki protein adezini vardır. *P. aeruginosa* iki çeşit hemolizin yapar; biri ısıya duyarlı, fosfolipaz C olarak adlandırılan bir protein ve diğeri ısıya dayanıklı bir glikolipittir. Lipit A endotoksini organizmanın biyolojik etkisini düzenler. Ekzotoksin A ise hücre dışı bir enzim olup, elongasyon faktör 2'yi ( EF2 ) inaktive ederek protein sentezini inhibe eder (15).

*Pseudomonas aeruginosa* sağlıklı insanlarda nadiren hastalığa neden olan, sık rastlanan bir insan saprofitidir. Bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlar (konak savunmasının bozulmasına neden olan yanık, kanser kemoterapisi, uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, üriner veya damar içi kateter,

endotrakeal entübasyon gibi savunma mekanizmalarının bozulduğu durumlar ayrıca nötropeni, hipogammaglobulinemi, kompleman eksikliği gibi) enfeksiyona zemin hazırlar (15). *P. aeruginosa* enfeksiyonu kolonizasyon, invazyon ve sistemik yayılım olmak üzere üç aşamada gelişir. Cilt ve mukoza yüzeylerine kolonize olan bakterilerin yayılımında virülans faktörleri, konağın immün direnci ve fiziksel savunma mekanizmaları önemli yer tutar. İnfeksiyon, kolonizasyon aşamasında kalabilir ya da sistemik enfeksiyona ilerleyebilir (16, 17). *P. aeruginosa*'nın virülans faktörleri ve biyolojik etkileri tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** *P. aeruginosa* 'nın virülans faktörleri ve biyolojik etkileri (15)

Virülans faktörleri	Biyolojik etkileri
<b>Yapısal Faktörler</b>	
<b>Kapsül:</b>	Mukoid polisakkaridin yapılması. Adhezyon sağlanması Antibiyotiklerin bakterisidal etkisinin azaltılması. Nötrofil ve lenfosit aktivasyonunun önlenmesi.
<b>Nöraminidaz:</b>	Pilusların adhezyonunun kolaylaştırılması.
<b>Piluslar ve nonpilus</b>	Akciğer ve yara yerine adhezyon sağlanması.
<b>Adezinler:</b>	
<b>Lipopolisakkarid:</b>	Endotoksik aktivite.
<b>Pyosyanin:</b>	Siliyer fonksiyonunun bozulması. İnflamasyonun başlatılması. Toksik oksijen radikallerinin salınması ve doku hasarı.
<b>Toksin ve Enzimler</b>	
<b>Ekzotoksin A:</b>	Protein sentezinin EF2 etkileyerek önlenmesi Doku hasarının oluşması
<b>Ekzototoksin S:</b>	İmmünsüpresyonun sağlanması
<b>Sitotoksin:</b>	Protein sentezinin önlenmesi, immünosüpresyon Lökosit fonksiyonlarının bozulması
<b>Elastaz, Alkalın proteaz:</b>	Pulmoner mikrovasküler yapıların hasarlanması
<b>Fosfolipaz C:</b>	Elastin içeren dokuların harabiyeti
<b>Rhamnolipid:</b>	İnflamasyonun başlatılması Lesitin içeren dokuların harabiyeti ve pulmoner siliyer aktivitenin inhibisyonu

*Pseudomonas*'larla oluşan infeksiyonların kontrolü ve önlenmesinde, hastane ortamının temiz ve kuru olmasını sağlamak, dezenfeksiyon ve sterilizasyon işlemini eksiksiz yerine getirmek gibi birtakım kuralların uygulanması gereklidir (18).

Ayrıca *P. aeruginosa*'nın hücre duvarından hazırlanmış en az iki ticari aşı vardır. Bu aşuların kistik fibrozlu hastalarda, ağır yanıklı hastalarda ve çocuklarda *Pseudomonas* infeksiyonlarının neden olduğu ölüm oranlarını azalttığı yönünde açıklamalar yapılmıştır (18).

Yoğun bakım hastalarında orofarenks ve sindirim sistemi çok önemli rezervuarlardır. Bu nedenle sindirim sistemi selektif dekontaminasyonu yoğun bakım hastalarında önemlidir. Yoğun bakım birimleri dirençli bakterilerin en fazla bulunduğu hastane ortamlarından biridir.

Tek bir antibiyotiğin sürekli ve yoğun olarak kullanımı dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamakta, ayrıca bu dirençli bakteriler yoğun bakım birimlerinde epidemiler oluşturabilmektedir. Bu yüzden dirençli kökenlerin ortaya çıkmasında uygulanan antibiyotik politikalarının rolü çoktur. *Pseudomonas* kökenleri ilk izolasyonda aminoglikozidlere (amikasin, gentamisin ve tobramisin) ve geniş spektrumlu penisilinlere (azlosilin, karbenisilin, mezlosilin, piperasilin ve tikarsilin) duyarlı olabilirler. Fakat bu penisilin türevleri uzun süre tek başına verildiğinde direnç gelişir. Bu yüzden yüksek doz aminoglikozid ve penisilinlerin birlikte verilmesi daha etkilidir. Ayrıca üçüncü kuşak sefalosporinler (sefoperazon, sefsulodin, seftazidim), dördüncü kuşak sefalosporinler (sefepim) ve klinik kullanıma girdiğinden beri sıkça kullanılan karbapenem grubu antibiyotiklerden imipenem ve meropenem *P. aeruginosa*'ya etkili bilinen en geniş spektrumlu antibiyotiklerdir (18, 19).

*Pseudomonas aeruginosa* antistafilokokkal penisilinler, sulbaktam-ampisilin, ampisilin, amoksisilin, amoksilin-klavulanik asit, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, sefotaksim, seftriakson, trimetoprim sulfametaksazol, nalidiksik asid'e doğal olarak dirençlidir. Tetrasiklinler, makrolidler, rifampin, kloramfenikol, sefiksim, sefpodoksime ise kural olarak dirençlidir. Tikarsilin, piperasilin, seftazidim, sefepim, sefpirom, sefoperazon, karbapenemler ve aztreonam antipseudomonal beta laktamlardır (20).

Geniş etki spektrumları nedeniyle karbapenemler, başta sefalosporinler olmak üzere 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 (19, 21).

Bakteriyel direnç gelişimi ile antibiyotik kullanımı arasındaki ilişki uzun zamandan beri dikkat çekmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalar yaygın antibiyotik kullanım ile direnç gelişimi arasında bir paralellik olduğunu açıkça göstermektedir (21).

### **1.2.Beta Laktam Antibiyotikler**

Günümüzde hastane içinde ve hastane dışında en sık kullanılan antibiyotik türevlerinin başında beta laktam antibiyotikler gelmektedir. Beta laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar:

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

Beta laktam antibiyotikler, etkilerini peptidoglikan sentezinde görevli olan transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe edip, hücre duvar sentezini durdurarak gösterirler (22). Beta laktam antibiyotiklerin gruplarının belirlenmesinde, bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirler rol oynar. Tüm beta laktam antibiyotikler bakterilerin sitoplazmik membranları üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan sentezinden sorumlu olan penisilin bağlayan protein (PBP) adı verilen hedef proteinlere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Beta laktam antibiyotik tarafından PBP'leri inhibe edilen bakteride hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan sentezlenemeyeceğinden hücre duvar yapısı bozulmaktadır. Bu durum bakterinin ozmotik direnç kaybına ve ölümüne neden olmaktadır. Beta laktam antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmaları ve etkinlik göstermeleri için GN bakterilerde porin (Outer Membran Protein, OMP) adı verilen içi su dolu protein kanalcıklarından geçmeleri, sitoplazmik membranla dış membran arasındaki periplazmik boşlukta yer alan beta laktamazlardan etkilenmemeleri gerekmektedir

(23). Gram pozitif bakterilerde dış membran bulunmayıp, sitoplazmik membranın üzerinde kalın bir peptidoglikan tabakası uzanmaktadır. Beta laktamazlar bu tabakaya yapışık veya bakteri hücresi etrafında serbest olarak yer almaktadır (24).

### **1.2.1. Penisilinler**

Penisilinler bir tiazolidin halkası, bir betalaktam halkası ve bir yan zincirden oluşan çekirdekten oluşur. İn vitro etki spektrumlarına göre sınıflandırılırlar ve bu sınıfların etkinlikleri kısmen de olsa çakışır.

#### **1.2.1.1. Doğal penisilinler**

Penisilin G, prokain penisilin G, kristalize penisilin G, benzatin penisilin G, penisilin V (Fenoksi metil penisilin)

#### **1.2.1.2. Penisilinaza dayanıklı penisilinler**

Metisilin, nafsilin, izaksazolil penisilin, kloksasilin, dikloksasilin, flukloksasilin, oksasilin

#### **1.2.1.3. Aminopenisilinler:**

Ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, siklasilin, episilin, hetasilin, pivampisilin

#### **1.2.1.4. *Pseudomonas*'lara etkili penisilinler:**

Karbenisilin, indanil karbenisilin (korindasilin), tikarsilin

#### **1.2.1.5. Geniş spektrumlu *Pseudomonas*'lara etkili penisilinlere:**

Azlosilin, mezlosilin, piperasilin

#### **1.2.1.6. Amdinopenisilinler:**

Amdinosilin, pivamdinosilin

#### **1.2.1.7. Beta laktam inhibitörlü kombine penisilinler:**

Ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat, tikarsilin/klavulonat, piperasilin /klavulonat doğal penisilinler ve penisilinaza dayanıklı penisilinler Gram pozitif

bakterilere etkilidirler. Aminopenisilinlerin etki spektrumu Penisilin G'ye benzer ve kendi üyeleri arasında da etkinlik açısından farklılık yoktur. Her ne kadar insan florasında yer alan çoğu *Escherichia coli* (*E. coli*), aminopenisilinlere duyarlı ise de hastane kökenli olan suşlarda plazmidlerle yayılan direnç yaygındır. *Shigella sonnei* (*S. sonnei*), *Salmonella typhi* (*S. typhi*) dahil çoğu *Salmonella* türleri beta laktamaza bağlı direnç gösterirler. Ayrıca *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Pseudomonas* türleri ve *Bacteriodes fragilis* (*B. fragilis*)'lerin çoğu penisilinlerin bu sınıfına dirençlidir. Çünkü tüm aminopenisilinler GN ve Gram pozitif bakterilerin beta laktamaz enzimlerine duyarlıdır. Bugün için GN basil infeksiyonlarında aminopenisilinler ampirik olarak seçilmemelidir. *Pseudomonas*'lara etkili penisilinler, *P. aeruginosa*'yı da içine alan pek çok aerob GN çomağa da etkili olan ilaçlardır. Piperasilin ve azlosilin şu anda *Pseudomonas*'lara en etkili penisilinlerdir. Hepsinin Gram pozitif bakterilere etkinlikleri, penisilin G ve aminopenisilinlerden daha azdır. Bu grup penisilin türevleri beta laktamazlara dirençli değildir.

Beta laktamaz inhibitörlü kombine penisilinler, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile ampisilin, amoksisilin, tikarsilin, piperasilin gibi penisilin türevlerinin aynı preparat içinde birleştirilmesi ile beta laktamaz salgılayan bakterileri de etki spektrumu içine alan ilaçlar olarak geliştirilmiştir. Ancak bu kombine preparatlardaki beta laktamaz inhibitörleri, tüm beta laktamazları inhibe edemezler. Bu ilaçlar genellikle *Staphylococcus*, *Haemophilus*, *Bacteriodes*, *Klebsiella* türleri ve *E. coli*'nin basit beta laktamazlarını inhibe ederler (25).

### 1.2.2. Sefalosporinler

Penisilinlere hem yapı hem etkinlik yönünden büyük yakınlığı bulunur. Beta laktam halkası yanında, penisilindeki 5 üyeli tiazolidin halkası yerine sefalosporinlerde 6 üyeli bir dihidrotiazin halkası yer alır. Dihidrotiazin halkasındaki fazla karbon atomu 3. pozisyona da yeni yan dalların ilavesi ile daha farklı ve çok sayıda sefalosporinler elde edilmesine olanak sağlamıştır. İkinci kuşak sefalosporinlerden sefoksitin, üçüncü kuşak sefalosporinlerden moksolaktam bir sefamisindir ve oksobeta laktam antibiyotik olarak da adlandırılır. Farmokolojik özellikleri, bakterilere karşı etkileri, kimyasal yapıları aynı olduğu için

sefalosporinler arasında ele alınırlar (26). Kronolojik esasa dayanan ve en çok kullanılan sınıflandırma şu şekildedir:

#### **1.2.2.1. 1.kuşak sefalosporinler**

Sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefalekssin, sefapirin, sefradin, sefadroksil, sefasetril, seftezol.

#### **1.2.2.2. 2. kuşak sefalosporinler**

Sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan.

#### **1.2.2.3. 3. kuşak sefalosporinler**

Sefotaksim, seftizoksim, sefoperazon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksim, sefpiramid

#### **1.2.2.4. 4. kuşak sefalosporinler**

Sefepim, sefpirom

#### **1.2.2.5. 5.kuşak sefalosporinler**

Seftabiprol, seftarolin

Parenteral uygulanan 1. kuşak sefalosporinlerin etkinlikleri birbirine benzerdir. Sadece sefazolinin stafilokoklara etkinliği biraz daha az, GN etkinliği ise diğer 1. kuşak üyelerine göre biraz daha fazladır. Birinci kuşak sefalosporinlerin esas olarak etkili olduğu bakteriler; metisiline duyarlı stafilokoklar ve pnömokoklardır. *Moraxella catarrhalis* (*M. catarrhalis*), *E. coli*, *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) ve *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumonia*)'ya etkinlikleri değişkendir. Bu kuşak sefalosporinlerin *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*), metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)ve enterokoklara etkinlikleri zayıftır. *Enterobacteriaceae* üyelerine etkinlikleri ise çok azdır. Birinci kuşak sefalosporinlerden herhangi birisi in vitro antibiyotik duyarlılık testinde diğerlerinin yerine kullanılabilir.

İkinci kuşak sefalosporinler, 1. kuşağa göre stafilokok ve streptokoklara daha az, GN basillere ve anaeroblara daha fazla etkilidir. GN basillere karşı etkideki

genişleme bazı *Enterobacter* türlerini, indol (+) *Proteus* türlerini ve *H. influenzae*'yı da kapsamaktadır, anaeroblara etkisi diğer kuşaklara göre daha fazladır. Özellikle sefuroksim, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* ve gonokoklara iyi etkilidir. Sefoksitin, GN basillerin ürettiği bazı beta laktamazlara dirençlidir ve bazı *Enterobacteriaceae*'lar tarafından üretilen beta laktamazların oldukça etkili indükleyicisidir. *E. coli*, *Klebsiella* ve indol negatif *Proteus spp.*'ye karşı 1. kuşak sefalosporinlerden daha etkilidir. Ancak *H. influenzae*'ya karşı 2. kuşak sefalosporinlerden daha az etkindir. Sefoksitin anaeroblara özellikle *B. fragilis*'e diğerlerinden daha fazla etkilidir. Ayrıca *Neisseria gonorrhoeae* (*N. gonorrhoeae*)'da beta laktamaz üreten kökenler de dahil iyi bir etkiye sahiptir. Parenteral kullanıldıktan sonra hızlı bir şekilde idrarla dışarı atılır.

Gram negatif basillere karşı üçüncü kuşak sefalosporinler yaygın olarak kullanılırlar. *E. coli*, *Klebsiella spp.*, *P. mirabilis*, indol (+) *Proteus*, *Providencia* ve *Serratia*'ya karşı etkilidirler. İkinci kuşaktakilerden klinik yönden en önemli farkları, *P. aeruginosa* kökenlerine de etkili olmaları ve diğer GN basillere ve *Neisseria* türlerine karşı daha güçlü etkinlik göstermeleridir. Gram pozitif koklara özellikle *S. aureus*'a karşı etkileri 1. kuşağa oranla çok zayıftır. Anaeroblara karşı etkileri değişik derecededir. Beyin omurilik sıvısına geçişleri 1. kuşağa göre daha iyidir (27).

### 1.2.3. Monobaktamlar

İlk sentetik monobaktam antibiyotik aztreonamdır. Beta laktam halkasına birleşik bir başka halka içermemelerinden dolayı penisilin ve sefalosporinlerden ayrılırlar. Aztreonam, GN bakterilerde PBP3'e bağlanarak duvar sentezini bozar. Gram pozitif bakterilerin PBP'sine bağlanamaz. Anaerob bakterilerin PBP'sine de düşük affinite gösterir. Bu yüzden etki alanı GN aerob bakteriler ile sınırlıdır. Aztreonam, parenteral uygulamadan sonra dokulara ve vücut sıvılarına çok iyi dağılır. *K. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* gibi sık rastlanan GN patojenlere etkilidir.

### 1.2.4. Karbapenemler

En geniş spektrumlu beta laktam antibiyotik grubudur. Sefalosporinlerdeki bir çift bağ içeren 5 üyeli halka yapısında bir metilenin yerine bir sülfürün geçmesiyle diğer beta laktam ajanlardan ayrılır. Karbapenemler *Streptomyces cattleya*



(*S. cattleya*) tarafından üretilen bir bileşik olan tienamisin türevleridir. Mikobakteriler, hücre duvarından yoksun organizmalar ve nadir non fermentatifler ve *Aeromonas* dışında hemen her bakteriyel patojene etkilidir. ESBL ve AmpC enzimini fazla miktarda üreten GN bakterilere karşı etkinliklerini korurlar (28). Karbapenemler çok geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye ve klinikte gözlenen birçok beta laktamaza karşı stabiliteye sahiptir. Ancak sınıf B metallo-beta-laktamazlar dahil, karbapenemazlar bu antibiyotikleri hidroliz edebilmektedir. Oldukça geniş etki spektrumu, iyi klinik etkinliği, uygun güvenlik profili ile karbapenemler, ağır infeksiyonların başlangıç tedavisinde ilk tercih edilecek olan antibiyotikler arasındadır (29).

#### 1.2.4.1. İmipenem

Bilinen en geniş spektrumlu antibiyotik olan imipenemin Gram pozitif, GN, aerob ve anaerob mikroorganizmalara etkinliği vardır. Bu mikroorganizmaların çoğu için MİK 4mg/L'nin altındadır. *Enterobacteriaceae* ve NFGN bakteriler için sınır MİK değerleri tablo 2'de görülmektedir. Farklı antibiyotik kombinasyonlarıyla kıyaslandığında, ciddi infeksiyonların tedavisinde son derece etkin bir monoterapötik ajandır ve in vitro olarak imipenem, klinik olarak önem taşıyan bakterilerin çoğuna etkilidir. Bu nedenle kritik hastalığı olan kişilerde özellikle dirençli GN etkenler veya polimikrobiyal infeksiyon düşünüldüğünde, kültür ve antibiyogram sonuçlarını beklemeden ampirik olarak başlanabilmektedir. Ciddi infeksiyonu olan immunkompromize hastalarda da güvenle seçilebilmesi avantaj oluşturmaktadır (30).

**Tablo 2.** Doripenem, ertapenem, imipenem ve meropenemin *Enterobacteriaceae* ve non fermentatif GN bakteriler için MİK değerleri (CLSI-M-100 S22, 2012).

	Disk			MİK			
	µg	S	I	R	S	I	R
<b>Doripenem</b>	10	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
<b>Ertapenem</b>	10	≥22	19-21	≤18	≤0,5	1	≥2
<b>Imipenem</b>	10	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4
<b>Meropenem</b>	10	≥23	20-22	≤19	≤1	2	≥4

#### 1.2.4.1.1. Yapı

Diğer beta laktam antibiyotiklerden farklı olarak sis konfigürasyonundaki açıl amino yan zincirinin yerine trans konfigürasyonunda hidroksietil yan zinciri içerir. İmipenemin trans konformasyonu beta laktamaz dayanıklılığını sağlar. Penisilin ve sefalosporinlerden farklı olarak  $\alpha$ -halkasında sülfür atomunda metilen (-CH<sub>2</sub>-) yapısı içerir. Bu yapı karbapenemlerin bakteri hücreindeki hedef proteinlere bağlanmasını arttırır. Bu da antibiyotiğin etki spektrumunu genişletir ve antibakteriyel gücünü arttırır. Molekül ağırlığının düşük olması bakterinin hücre membranından girişini kolaylaştırır. Penem halkasında bulunan alkil tiyo yan zinciri ise *P. aeruginosa*'ya etkinliği sağlamaktadır (31).

İmipenem beta laktamaz direncine ve olağan üstü geniş etki spektrumuna karşın, böbrekte ileri derecede enzimatik yıkıma uğrar. Metabolitinin nefrotoksik bir ajan olması nedeniyle tek başına kullanılamaz. Bir dehidropeptidaz-1 (DHP-1) inhibitörü olan silastatin ile 1/1 oranında birleştirilerek pazarlanmaktadır. Silastatin sodyum, DHP-1'in kompetitif, reversibl ve özgül inhibitörüdür. Silastatinin antibakteriyel etkinliği ya da beta laktamazlar üzerine etkisi yoktur. İmipenemin etkisini antagonize etmez (32, 33).

#### 1.2.4.1.2. Etki mekanizması

Diğer beta laktam antibiyotikler gibi imipenem; bakteri hücre duvar sentezini inhibe ederek bakterisidal etki gösterir. Bu etkilerini Gram pozitif ve GN bakterilerin yüksek molekül ağırlıklı PBP'lerine yüksek bir afinite ile bağlanarak gösterir. Önce PBP2'ye, sonra da PBP1a'ya bağlanır. PBP2'ye bağlanarak GN basillerin sferoblastlara dönüşmesini sağlar. Ek olarak PBP1'e bağlanması Gram pozitif ve GN bakterilerde hücrelerin daha hızlı lizisine yol açar. *E. coli*'de PBP1a, 1b, 2, 4, 5 ve 6'ya; *P. aeruginosa*'da PBP1a, 1b, 2, 4, 5'e bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe eder (34, 35). Dış membrana penetrasyon GN bakterilerde daha fazladır (36). Düşük molekül ağırlığı ve zwitteryonik nötral yük nedeniyle bakterinin hücre duvarına, penisilin ve sefalosporinlerden daha hızlı penetre olur (37).

#### **1.2.4.1.3. Farmakokinetik ve farmakodinamik**

İmipenemin plazma yarılanma ömrü yaklaşık bir saattir. Serum proteinlerine bağlanma oranı % 10-20 arasında olup, imipenem % 20, silastatin ise % 40 oranında bağlanır. Verilen dozun % 70'i yaklaşık 10 saat içinde idrarda saptanır. Total dozun % 48.6'sı idrarla değişmeden atılmaktadır (38).

#### **1.2.4.1.4. Yan etkiler**

Enjeksiyon yerinde ağrı, flebit ve tromboflebit (%1,7) en sık görülen yan etkilerdir. Bulantı (% 1,4), kusma (% 0,9), oral mukozada değişiklikler (% 0,3), ishal (% 0,9) ve psödomembranöz enterokolit (% 0,1) gastrointestinal sistemle ilişkili olan yan etkileridir. Ciddi yan etkiler nadirdir. Diğer beta laktamlara alerjisi olan hastalar imipeneme de alerjik olabilir. İmipenem kullanımında çeşitli alerjik reaksiyonlar (ateş, kaşıntı, deri döküntüsü, solunum sıkıntısı) görülebilmektedir. Santral sinir sistemi toksisitesi (konfüzyon, huzursuzluk, konvülziyon, tremor) görülebilir. İnfüzyon hızına bağlı olarak bulantı, kusma, terleme ve halsizlik olabilir. Konvülziyon için esas risk faktörleri yüksek dozda kullanım ve hastanın renal yetmezliğinin olmasıdır. Renal hastalığı olan veya santral sinir sistemi patolojisi olanlarda konvülziyona neden olması, bulantı ve kusma yan etkileri imipenem kullanımını kısıtlamaktadır. Enjeksiyonu yavaş infüzyon gerektirmektedir (37).

#### **1.2.4.2. Meropenem**

Önemli tüm aerobik ve anaerobik bakterilere karşı son derece etkilidir. İmipenemden farklı olarak insan böbrek dehidropeptidaz I (DHP-1) enzimine karşı çok yüksek stabilite gösteren bir karbapenemdir. Dolayısıyla silastatinle kombine edilmesi gerekmez. Hem imipenemin hem de meropenemin başlıca hedefi PBP2' dir. Ancak meropenem, *P. aeruginosa* ve *E. coli*'nin PBP2 ve 3'üne daha büyük bir afinite gösterir. Meropenem, stafilokoklara ait enzimler ve GN bakterilerdeki karbapenemazlar hariç diğer tüm beta laktamazların hidrolizine karşı dayanıklıdır. Karbapenemlerden meropenem, GN'lere özellikle de *P. aeruginosa*'ya daha etkili gözükmektedir (39, 40). Meropenem genel olarak 3.kuşak sefalosporinlerden daha güçlü bir

indükleyici olmasına karşın, *Enterobacter* ve *P. aeruginosa* izolatlarındaki grup 1 beta laktamazlar üzerindeki indükleyici etkisi imipeneme göre daha zayıftır (41, 42). İmipenemin afinitesi sadece *P. aeruginosa*'daki PBP2'ye iken meropenemin PBP2 ve PBP3'e karşı yüksek afinitesi vardır. Bu durumun, özellikle meropenemin *P. aeruginosa* üzerinde daha güçlü bir etki gösterebilmesinde katkısının olabileceği ifade edilmektedir (40, 43). Meropenem için asıl hedef *P. aeruginosa*'daki PBP3'dür (39, 40, 44).

### **1.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları**

Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde genel olarak 3 genetik mekanizma vardır.

#### **1.3.1. Kromozomal genlerde mutasyon oluşması**

Hücresinin üremesi ve devamı için yaşamsal önemi olan proteinler, çoğunlukla antibiyotiklerin bakteri hücreindeki hedefleridir. Direnç mutasyonları, antibiyotiklerin hedefinden başka, bakterideki düzenleyici genlerde de oluşabilmektedir. DNA replikasyonu sırasında her gende  $10^{-9}$  ile  $10^{-10}$  sıklıkta mutasyon oluşabilmektedir. *Enterobacter spp.*'de kromozomal Amp C beta laktamaz üretiminin artışı, *P. aeruginosa*'da OmpD porininin ifadesinin azalması ile imipeneme direnç oluşması ve atım pompalarının etkisi bu tip dirence örneklerdir. Mutasyon ile oluşan direncin kalıcı olması, bakterinin buna ne kadar dayanabildiğine bağlıdır. Örneğin, OmpD porininin ifadesinin azalması çabuk gelişebilmesine karşı yaygın bir direnç mekanizması değildir. Büyük olasılıkla bu porin, bakteri için yaşamsal olduğundan imipenem olmadığında bakteri bu porinleri tekrar yapmaktadır. Direnç kazanmanın bakteriye zararlı olan etkileri "fitness cost" (dayanıklılığın bedeli) olarak tanımlanmaktadır. Buna karşın, mutasyonların bakterideki zararlı etkileri bazen bakteri tarafından başka yollar ile telafi edilebilmektedir. Eğer mutasyon ile gelişen direnç bakteriye zarar vermeden yüksek sıklıkta ortaya çıkıyorsa, o antibiyotik kullanıldığında kısa bir süre içinde direnç gözlenecektir.

#### **1.3.2. Direnç genlerinin dışarıdan alınması**

Duyarlı bakterilere direnç genlerinin geçişinde en sık gözlenen mekanizma konjugatif plazmidlerin geçişidir. Bu kromozom dışı replikatif DNA şekilleri, birçok

geni kodlamaktadır. Bazı plazmidler birçok farklı tür bakteriye girip replike olabilmesine karşın bazıları ise konak açısından çok özgüldür. Direnç genleri plazmidler arasında çoğunlukla transpozonlar tarafından taşınmaktadır. Transpozonlar direnç genlerini, bir plazmidden plazmide veya kromozoma ya da kromozomdan plazmide taşıyabilmektedir. Bazı transpozonlar bakteriden bakteriye de geçebilmektedir. Ancak bunlar çoğunlukla Gram pozitif bakterilerde gözlenmektedir. İntegronlar direnç determinantlarının alınmasını ve ifadesini kolaylaştıran doğal rekombinasyon sistemleridir. GN bakterilerde, çoğunlukla plazmid ve transpozonlarda çok yaygın olarak bulunmakta ve özellikle sülfonamid ve streptomisine direncin yayılmasında önemli rol oynamaktadırlar. Çeşitli beta laktamazlar ve aminoglikozid değiştirici enzimlere ait genler integronlarda bulunmaktadır. İntegronların direnç genlerinin yayılımı ve ifadesi için önemli bir kapasiteleri olmasına karşın GN bakterilerde daha yaygın olan genlerin integronlardan çok transpozonlarda taşındığı gözlenmektedir.

### **1.3.3. Dışarıdan alınan genlerde mutasyon oluşması**

Gram negatif bakterilerde son yıllarda sayıları artmış olan ESBL enzimleri bu mekanizmaya en iyi örnektir. ESBL'lerin plazmid kontrolünde sentezlenen TEM-1 beta laktamazından 1-2 noktada mutasyon olması sonucu türediği saptanmıştır (45).

Beta laktam antibiyotiklerin etki gösterebilmeleri için dış zardan ve periplazmik aralıktan geçerek PBP'lere etkin konsantrasyonda ulaşması ve bağlanması gereklidir. Bakteriler, bu basamakların her birinde bir engel oluşturarak direnç geliştirebilirler.

Bakterilerde beta laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç 3 yolla gelişebilmektedir:

- 1) İlacın hedef bölgesi olan penisilin bağlayan proteinler (PBP)'de meydana gelen değişiklikler
- 2) Dış membran geçirgenliğinin bozulması
- 3) Beta laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi

### **1.3.4. İlacın hedef bölgesinde gelişen değişiklikler**

Membrana bağlı proteinler olan PBP'ler beta laktam antibiyotiklerin hedef bölgesidir. PBP'lerdeki değişiklikler; PBP'nin beta laktam antibiyotiğe afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma olması veya beta laktam antibiyotiklere düşük

afinite gösteren yeni PBP'lerin sentezlenmesi kromozomal mutasyonlar sonucu oluşabilmektedir (46, 47). PBP'lerdeki değişiklikler ile ortaya çıkan bu tür dirence örnek *N. gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis* (*N. meningitidis*), *H. influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*)'da gözlenen penisilin direnci ve metisiline dirençli *S. aureus*'da gözlenen dirençtir (48). Bu durum GN bakterilerde nadir görülen bir direnç türüdür.

### 1.3.5. Dış membran geçirgenliğinin bozulması

Gram negatif bakteriler için hücre zarının geçirgenliğinin azalması özellikle önem taşır. Gram pozitif bakterilerin membranlarına nazaran Gram negatif bakterilerin membranları daha komplike bir yapıya sahiptir. Beta laktam antibiyotikler, GN bakterilerde dış membrandaki "outer mebrane protein (OMP) adı verilen porlar yolu ile hücreye girmektedir. Bu 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. Bu yüzden bir GN bakteri porin F ve porin C proteinlerini mutasyona uğratarak tüm beta laktamlara direnç geliştirebilirken, imipeneme duyarlı kalır. Öte yandan, özellikle *P. aeruginosa* ve *Enterobacter* suşlarında dış membrandan D2 proteinin kaybolması bakteriyi imipeneme dirençli hale getirebilir. Ancak bu tipte direnç geliştiren bakteri, diğer beta laktam antibiyotiklere karşı çapraz direnç geliştiremez (49). Porinlerin özellikleri ve sayıları ile antibiyotiğin özellikleri (yük, çözünürlük, büyüklük) hücre içine giriş hızını belirlemektedir (48). Çoğu sefalosporin ve geniş spektrumlu penisilinler moleküler yapılarındaki uzun yan zincirler nedeniyle porinlerden nispeten yavaş geçerler. Diğer beta laktam antibiyotiklere kıyasla daha düşük moleküler ağırlıkta olduğundan imipenem, porinlerden daha hızlı bir geçiş göstermektedir. Antibiyotiğin bakteriyel etkinliği açısından periplazmik boşlukta kısa sürede yüksek konsantrasyonlara ulaşabilme özellikleri de önemlidir (50). Geçirgenliğin azalmasına bağlı olan direnç özellikle enzimatik direnç ile birlikte ise yüksek düzeyde dirence yol açmaktadır. Bu direnç *P. aeruginosa* ve zor üreyen GN basillerde daha fazla klinik probleme yol açar.

### 1.3.6. Beta laktamaz enzimleri ile ilacın inaktive edilmesi

Bakterilerin beta laktam antibiyotikleri inaktive eden beta laktamaz enzimlerini sentezlemesi, beta laktam antibiyotiklere karşı en çok gözlenen direnç mekanizmasıdır. Bakteri kromozomunda veya plazmid, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda beta laktamaz genleri bulunabilir (51). Beta laktamazlar Gram pozitif türlerde doğrudan dış ortama salınırken GN bakterilerde, dış membran ile sitoplazmik membran arasındaki periplazmik boşlukta bulunmaktadır. Bu nedenle GN bakteri türlerinde beta laktamazlara bağlı dirençte sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalar da rol oynamaktadır (52). Beta laktamazlar, beta laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak beta laktam ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Yapısal olarak PBP'lerden evrimleştiklerini düşündürecek kadar, PBP'lere benzerler. Gram pozitif, GN ve anaerob bakteriler tarafından sentezlenir. Gram pozitif bakteriler arasında beta laktamaz üreten en önemli patojen stafilokoklardır. Anaeroblardan *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta laktamazları esas olarak penisilini parçalarken *Bacteriodes*'ler tarafından üretilen beta laktamazlar ise sıklıkla sefalosporinaz etkinliği göstermektedir. GN bakteriler, daha çok sayıda beta laktamaz üretirler. GN bakterilerin beta laktam direncindeki en önemli mekanizma beta laktamaz üretimidir (53).

### 1.4. Beta laktamazlar

Abraham ve Chain'nin penisilinazı ortaya koyduğu 1940 yılından bugüne kadar 400'e yakın beta laktamaz enzimi tanımlanmıştır. 1980'de Ambler tarafından moleküler yapılarına göre 4 sınıfa ayrılmışlardır (54);

**Sınıf A:** Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, öncelikle penisilinleri hidroliz eden beta laktamazlardır. GN bakterilerde en sık bulunan TEM-1 enzimi bu gruba iyi bir örnektir.

**Sınıf B:** Aktive gösterebilmeleri için çinkoya bağlı tiyol grupları gerektiren metallo-enzimlerdir.

**Sınıf C:** Aktif bölgelerinde serin aminoasit taşıyan, öncelikle sefalosporinazlardan oluşan, kromozomal AmpC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC enzimler olarak da adlandırılan enzimlerdir.

**Sınıf D:** Oksasilini hidroliz eden serin beta laktamazlardır.

Bush, Jacoby ve Mederios tarafından 1995 yılında biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerine göre beta laktamazları 4 gruba ayırdıkları sınıflandırma beta laktamazların en yeni sınıflandırma şemasıdır. Bu grupların genel özellikleri tablo 3’de görülmektedir. Grup 1’de klavulanik asit ile inhibe olmayan sefalosporinazlar, Grup 2’de beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan moleküler sınıf A ve D içinde yer alan enzimler, Grup 3’te EDTA dışındaki beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olmayan metallo-beta-laktamazlar, Grup 4’te ise klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bulunmaktadır (55).

**Grup 1:** Moleküler sınıflamada sınıf C’de yer alırlar. Bunların birçoğu kromozomal enzimlerdir ve indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Grup 1 enzimlerini kodlayan genler plazmidlerde de görülebilmekte ve *Enterobacteriaceae* arasında transmisyon yoluyla aktarılabilmektedir. Kromozomal AmpC enzimleri, ayrıca plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, BIL-1 beta laktamazları da bu grupta yer almaktadır. Klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmezler, buna karşı aztreonam ve kloksasilin tarafından inhibe edilirler. Sefaloridin ve sefalotini penisilinden daha hızlı hidroliz ederler. Karbapenemlere karşı da duyarlıdırlar.

Kromozomal grup 1 beta laktamazlar *Salmonella* dışında hemen tüm GN bakterilerde bulunur. Ancak sentez miktarı açısından farklılıklar göstererek yüksek veya düşük düzeyde üretilebilir. *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Shigella spp.*’de ampisilin ve dar spektrumlu sefalosporinlere karşı direnç oluşturmayacak kadar düşük düzeyde sentezlenen yapısal enzimler vardır. Buna karşın *E. coli* izolatlarının % 2’sinde AmpC enzimlerinin aşırı sentezi sonucu yüksek düzeyde direnç oluşabilmektedir (44).



**Tablo 3.** Beta laktamaz grupları ve genel özellikleri (54)

Betalaktamaz Grubu	Alt Grup	Moleküler Sınıf (Ambler)	Substrat	Özellik
1		C	Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (ancak plazmidde de kodlanabilir) Klavulanik asitle inhibe olmaz.
2		A, D		Birçoğu klavulanik asitle inhibe olur.
	2a	A	Penisilinler	Stafilokok ve enterokoklardaki Penisilinazlar.
	2b	A	Penisilinler Sefalosporinler	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu betalaktamazlar (TEM-1, TEMSHV-1)
	2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrumlu Sefalosporinler	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar (GSBL)
	2br	A	Penisilinler	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) Beta laktamazlar
	2c	A	Penisilinler	Karbenisilini hidroliz eden Enzimler
	2d	D	Penisilin, Oksasilin	Oksasilini hidroliz eden Klavulanik asit ile az inhibe olurlar.
	2e	A	Sefalosporinler	Klavulanik asit ile inhibe olan Sefalosporinazlar
	2f	A	Penisilin, Sefalosporin, karbapenemler	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler
3	3a, 3b, 3c	B	Karbapenemler dahil bir çok beta-laktam	Metallo-beta-laktamazlar.
4		?	Penisilinler	Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş

Kromozomal beta laktamazlardan; *Enterobacter spp.*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter freundii* (*C. freundii*), *Serratia spp.*, *Morganella morganii* (*M.*

*morganii*), *Providencia stuartii* (*P. stuartii*) ve *Providencia rettgeri* (*P. rettgeri*)’de sentezlenen beta laktamazlar indüklenabilen türdedirler (23,56). Bu enzimler normalde bakteri tarafından bir baskılayıcı mekanizma ile düşük düzeyde sentezlenirken ortama bir penisilin ya da sefalosporin eklendiğinde enzim sentezinde birkaç yüz kat artış olabilmektedir (56). Değişik oranlarda olmak üzere farklı beta laktam antibiyotikler Grup 1 beta laktamazları indükleyebilirler. Ancak, indükleyici beta laktamın ortadan kalkmasıyla bakteri tekrar eski bazal beta laktamaz sentezine geri döner. Bu yüzden bu mekanizma ile klinikte kalıcı bir direnç söz konusu olmaz. Ana problem bu enzimleri doğal olarak fazla miktarda sentezleyen mutant suşlar nedeniyle oluşur. İndüklenabilir kromozomal beta laktamaz taşıyan bu GN bakterilerde normalde  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  arasında bir sıklıkla baskılanmış mutantlar bulunur. Beta laktamaz enzimlerinin sentezi bu baskılanmış mutantlarda devamlı ve yüksek düzeyde olmaktadır. Böyle bakterilerle oluşan infeksiyonların bir indükleyici antibiyotik ile tedavisi sırasında duyarlı bakterilerin ortadan kalkması ve antibiyotik etkisine dirençli doğal mutantların ortamda çoğalması ile tedavi başarısızlıkları olabilmektedir. Dirençli bakterilerin hastane mikroflorasına yerleşmesine bağlı olarak da hastane infeksiyonu epidemileri ortaya çıkabilmektedir (56, 23).

**Grup 2:** Tümü moleküler sınıf olarak A ve D’de yer almaktadır. En geniş kategoriyi oluşturan bu grup substrat profilindeki farklılık nedeniyle birkaç alt gruba ayrılmaktadır. Penisilinleri, sefalosporinleri, kloksasilini, karbenisilini, karbapenemleri ve monobaktamları hidroliz etmelerine göre 6 alt gruba ayrılırlar (57). TEM ve SHV grubu enzimler, 2b, 2be ve 2br alt grubunda bulunan sık soyutlanan türlerde yaygın olmaları ve plazmidlerce taşınmaları nedeniyle klinik açıdan önem taşımaktadırlar (23,56, 58).

**2a:** *S. aureus*’un enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *Bacillus Cereus* (*B. Cereus*)’un kromozomal beta laktamazları, *Citrobacter amalonaticus* (*C. amalonaticus*), *Eikenella corrodens* (*E. corrodens*) ve *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*)’da tanımlanan enzimler de bu gruptadır. Bu alt grupta penisilini hidrolize eden, klavulanik asite duyarlı enzimler bulunmaktadır (55).

**2b:** Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi hem penisilin hem sefalosporinleri hidrolize eden beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı beta laktamazları içerirler (23). Bu enzimlere ampisilin, karbenisilin, tikarsilin, sefalotin gibi beta

laktam antibiyotiklere direnç oluşturmaları nedeniyle geniş spektrumlu denilmiştir. Plazmid kontrolündeki “geniş spektrumlu” TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri bu gruptadır. *Enterobacteriaceae* ailesinde TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 beta laktamazları yaygın olarak bulunur. TEM-1 beta laktamızı özellikle *E. coli* suşlarında ampisilin ve amoksisilin direncine neden olan mekanizmalar arasında en sık görülenidir. Ayrıca TEM-1 enzimi, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinde olduğu gibi *Haemophilus*, *Vibrio* ve *Neisseria* gibi diğer cinslerde de bulunur. SHV-1 özellikle *K. pneumoniae* suşlarında bulunur. Ayrıca OHİO-1 ve *H. influenzae*'da saptanan ROB-1 enzimini de içermektedir (58, 59).

**2be:** Oksiimino beta laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM ve SHV enzimleri gelişmiştir (58). Bunlar grup 2be'de yer almakta ve ESBL (genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar) olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta ilk kez Türk izolatlarında saptanan enzimlerden biri olan PER-1 enzimi de yer alır (60, 61).

**2br:** TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi bu gruptadır. Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta laktamazlar bu gruba alınmıştır.

**2c:** Bu grup içinde karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta laktamazları, *Aeromonas hydrophilia* (*A. hydrophilia*)'nin AER-1 enzimi, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*)'nin SAR-1 enzimi de bu gruptadır.

**2d:** Grup 2'nin diğer alt gruplarında bulunan tüm enzimler, moleküler sınıf A'da yer alırken, sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alır. Bu grup, kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta laktamazları içermektedir. OXA enzimleri bu gruptadır. Türkiye'de izole edilen OXA-11 enzimi de bu grupta bulunur (62). Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler.

**2e:** Bu gruptaki beta laktamazlar sefalosporinaz olmalarına karşın, grup 1'dekilerden farklı olarak klavulanik asitle inhibe olmaktadır. *E. coli*'den izole

edilen FEC-1 *Yersinia enterocolitica* (*Y. enterocolitica*)’dan izole edilen Blal ile *S. maltophilia*’nın L2 ve *B. fragilis*’in CepA enzimi, *Bacteriodes uniformis* (*B. uniformis*) ve *Bacteriodes vulgatus* (*B. vulgatus*)’un kromozomal CblA ve CfxA enzimleri bu grupta yer almaktadır (55).

**2f:** Karbapenemleri hidroliz eden, klavulanik asit ile inhibe olan *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*)’nın indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*’nin kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens* (*S. marcescens*)’in Sme-1 enzimi bu grupta yer almaktadır (55).

**Grup 3:** Moleküler sınıf B’de yer alan metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimleri bu grubu oluşturur. Metallo-beta-laktamaz (MBL) enzimleri, monobaktamlar dışında karbapenemler dahil tüm beta laktamları hidrolize edebilirler. EDTA ile inhibe olurlar. Klavulanik asit veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olmazlar. Aktiviteleri için Zn (çinko) iyonlarına gereksinimleri vardır. Bu beta laktamazlar a,b,c olmak üzere 3 alt gruba ayrılırlar.

**3a:** Bu enzimler; penisilinleri, karbapenem ve sefalosporinlerden daha etkili olarak hidrolize edebilen, *B. cereus II*, *B. fragilis* (CcrA) ve *S. maltophilia* (L1 enzimi) kromozomal beta laktamazlarından oluşur.

**3b:** Grup 3a enzimlerinin aksine 3b enzimlerinin, penisilin ve sefalosporin üzerinde hiç hidrolitik etkileri yoktur. Büyük ölçüde *Aeromonas* cinsinden türeyen *A. hydrophilia*’da bulunurlar ve bazen gerçek karbapenemaz olarak adlandırılırlar. Bu da onların zor belirlenmesine neden olur.

**3c:** Bu grupta sadece *Legionella gormanii* (*L. gormanii*)’nin beta laktamazı vardır. Bu enzim, genişletilmiş spektrumlu MBL enzimi olup 3a ve 3b grup enzimlerinden daha geniş etki spektrumuna sahiptir ve çoğu sefalosporinleri hidroliz edebilir (63).

**Grup 4:** Bu grubu, klavulanik asit ile iyi inhibe olmayan küçük penisilinazlar oluşturur. Biri dışında hepsi kromozomaldır. *Alcaligenes faecalis* (*A. faecalis*), *B. fragilis*, *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*)’den izole edilen enzimler, *Clostridium butyricum* (*C. butyricum*)’un indüklenebilen enzimi, *E. coli*’nin plazmid kontrolündeki SAR-2 beta laktamazı bu gruba dahil edilmiştir. *Pseudomonas cepacia* (*P. cepacia*)’daki beta laktamazlar da bu gruptadır. Yapıları tam olarak saptanamamıştır ve molekül sınıfı henüz belirlenmemiştir.

Bu 4 grup beta laktamazın tümü, fonksiyonlarındaki çeşitliliği sergiler. Bir bakteride, aynı anda birden çok beta laktamaz tipi görülebilir ve bu çok sık rastlanılan bir durumdur. Bu nedenle kromozomal ve plazmid kökenli beta laktamazlar bazen iç içe geçerler. Grup1'deki kromozomal beta laktamazlar, Grup 2'deki ESBL enzimler ve Grup 3'deki beta laktamazlar, hastane infeksiyonlarında en sık sorun olarak karşılaşılan enzimlerdir.

#### **1.4. Karbapenemlere Direnç Mekanizmaları**

Bilinen 3 farklı etki mekanizması ile karbapenemlere karşı direnç gelişebilmektedir:

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

###### **1.4.1.1. Porin değişimleri**

*Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı bu grup antibiyotiklere direnç gelişmesine neden olmaktadır. OprD kaybı özellikle imipenem tedavisi sırasında gelişmektedir (64). Bu, özellikle *P. aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizmasıdır.

###### **1.4.1.2. Aktif pompa sistemlerinin indüklenmesi**

##### **1.4.2. Karbapenemleri hidroliz eden enzimlerin varlığı**

En geniş spektrumlu antibakteriyel etkinliğe sahip beta laktam sınıfı olan karbapenemlerden birini, en azından imipenem veya meropenemden birini hidrolize eden beta laktamazlar olarak tanımlanabilirler. Karbapenemazlar yalnız karbapenemlere değil, diğer beta laktam ajanlara da etkilidirler (29, 64).

###### **1.4.2.1. Ekstrinsik (kazanılmış) karbapenemazlar**

*Acinetobacter spp.*, *P. aeruginosa* ve *Enterobacteriaceae*'da bulunur. Ambler moleküler sınıflamasına göre A, B veya D sınıfına ait olabilirler. Sınıf D tipleri sadece *Acinetobacter spp.*'de, sınıf A tipleri ise birkaç *Enterobacteriaceae* izolatında bulunurlar. Bunlar imipenem, meropenem, penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama direnç gelişmesine neden olup tazobaktam başta olmak üzere beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olan enzimlerdir.

#### 1.4.2.2. İntrensik (kromozomal) karbapenemazlar

Bu enzimler moleküler sınıf B'de yer alır ve aktif bölgelerinde çinko iyonları bulunduklarından beta laktamazlar içinde kendine ait özgün özelliğe sahiptir. Katalitik aktivite çinko iyonuna bağlıdır ve EDTA ile birleştiğinde kaybolur. Diğer moleküler sınıflara (A, C ve D) ait beta laktamazlar çinko içermezler, serin bazlı mekanizmaları vardır ve birkaç istisna dışında önemli düzeyde kromozomal karbapenemaz etkinlikleri yoktur. Bu grupta, *B. cereus II*, *B. fragilis*'in CcrA, *B. cepacia*'nın PCM-1, *S. maltophilia*'nın L1, *Chryseobacterium indologenes* (*C.indologenes*)'in IND-1-4, *Chryseobacterium meningosepticum* (*C.meningosepticum*)'un BlaB enzimleri sayılabilir. Bunların tümü Bush sınıflandırmasında grup 3'te yer alan metallo-beta-laktamazlardır.

#### 1.4.3. Hedef PBP değişimleri

Diğer mekanizmalar ile birliktedir. Tek başına nadir görülür.

#### 1.5. Metallo-Beta-Laktamazlar

Serin beta laktamazlar içinde sınıflandırılmış bu enzimler, 1980 yılında Ambler tarafından sınıf B olarak kategorize edilmiş, daha sonra 1989 yılında Bush fonksiyonel özelliklerine göre bu enzimleri ayrı bir grup olan fonksiyonel grup 3 içerisinde sınıflandırmıştır. Bu sınıflama 1995 yılında güncellenmiş ve 1997 yılında modifiye edilmiştir (64, 65).

Monobaktamlar dışında tüm beta laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilmeleri bu enzimlerin en önemli özelliğidir. Bunlar, diğer beta laktamazlardan farklı olarak aktif bölgelerinde çinko iyonu bulunan enzimlerdir. EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olurlar. Ancak serin beta laktamaz inhibitörlerinden (klavulanat, tazobaktam ve sulbaktam gibi) etkilenmezler. İlk metallo-beta-laktamaz enzimi 1960 yılında *Bacillus cereus*'ta tanımlandı, daha sonra 1980 li yılların başında *S. maltophilia*'da gösterildi. Daha sonra *B. fragilis* ve *A. hydrophilia* da imipenemi hidrolize eden metallo-beta-laktamaz enzimi tanımlandı.

*Serratia marcescens* ve *P. aeruginosa* suşlarında plazmid kökenli bir metallo beta-laktamaz-enzimi (IMP-1) Japonya'da 1991 yılında bulununcaya kadar sadece bu grupta kromozomal enzimlerin varlığı biliniyordu. Aktarılabılır metallo-beta-

laktamaz enziminin bulunmasıyla karbapenemlere direnç gelişimi ile ilgili endişeler artmıştır. Metallo-beta-laktamazları kodlayan genler genelde klas 1 (bazen klas 3) integronlarca taşınıp, sonra transpozonların içine yerleştirilip yüksek derecede aktarılabılır bir genetik araç elde edilir. Ayrıca integron içindeki başka gen kasetleri, aminoglikozid direncine de neden olarak bu antibiyotiklerin alternatif tedavide kullanımını engeller. Bütün metallo-beta-laktamazlar imipenemi hidrolize ederler; ancak bu özellikleri oldukça değişkendir ve hidroliz etme hızı bakterinin karbapenemlere direncinin seviyesi ile korele olmayabilir. Buna göre bu enzimler imipenem ve diğer beta laktamları hidrolize etme temeline göre alt gruplara ayrılmıştır (alt grup 3a, 3b, 3c) (64, 66).

Metallo-beta-laktamazlar standardize edilmesi ve moleküler düzeyde sınıflanması oldukça zor, hemen hemen imkansız gibi görünen, ayrı bir enzim grubudur. Substrat profillerinin yanı sıra sekans özellikleri ve diğer yapısal özellikleri baz alınarak alt gruplara ayrılması yönünde çeşitli denemeler yapılmıştır. Bu enzimler üç alt sınıfta gruplandırılmıştır.

Sınıf B1 çinko iyonu ile birleşecekleri aktif bölgelerinde üç histidin bir sistin aminoasidi içeren enzimlerden oluşur. Bu grup içerisinde transfer edilebilen IPM, VIM, GIM ve SPM-1 enzimleri bulunur. Sınıf B2 de bulunan enzimlerde ise birinci pozisyonda histidin yerine asparajin bulunur. Bu gruba örnek olarak SFH-1 enzimi verilebilir. Sınıf B3'de ise tetramer yapısındaki L1 enzimi bulunur (67).

### **1.5.1. Metallo-beta-laktamazların biyokimyası**

Hem serin beta laktamazlar hem de metallo-beta-laktamazlar, beta laktam halkasındaki amid bağı kırarak antibiyotik direncine neden olmasına rağmen iki grup enzimin etki mekanizması tamamen farklıdır.

Metallo-beta-laktamazların kristal yapısının bilinmesi katalitik etkileri konusunda önemli katkılarda bulunmuştur. Farklı metallo-beta-laktamaz enzimleri % 25'ten daha az ortak amino asit yapılarına sahip olsa da, hepsinin ortak özelliği  $\alpha\beta\beta\alpha$  katlantısının bulunması ve aktif bölge yapılarının süperimpoze olmasıdır (68).

Metallo-beta-laktamazların çok esnek olan halka yapısı beta laktam substratların bağlanmasını ve hidrolizini başlatır. Beta laktamazlardan farklı olarak, birçok beta laktam metallo-beta-laktamazlara substrat olabilir ve bu özellikleri çok

geniş spektrumlu aktivitelerinin olmasını sağlayabilir. İlginç olarak, metallo-beta-laktamazların hiçbirisi aztreonamı çok iyi hidrolize etmez ve bu özellik nedeniyle aztreonamın, terapötik metallo-beta-laktamaz inhibitörü olabileceği ileri sürülmüştür. Klavulanik asit ve sulbaktam gibi zayıf substrat kabul edilen serin inhibitörlerinden de etkilenmez. Bir enzimin substrata olan ilgisi  $K_m$ , enzimin substrata bağlanma gücü  $k_{cat}$  ile ifade edilirken  $k_{cat}/K_m$ , enzimin katalitik verimliliğinin ölçüsüdür. Enzimler katlantı ve aktif bölge yapısında ortak özellikleri paylaşırsa da, beta laktamları bağlama ve hidrolize etme özellikleri değişken olabilir. Bunun en önemli örneği yapısal olarak birbirine çok benzeyen VIM-1 ve VIM-2 arasındaki farktır. Örneğin, VIM-2 birçok beta laktama VIM-1'den daha sıkı bağlanmaya yatkındır ve benzil penisilin, ampisilin, piperacilin, mezlosilin, tikarsilin, sefalotin, sefoksitin, sefotaksim, seftazidim, sefpirom, moksalaktam ve meropenem için kayda değer derecede düşük  $K_m$  düzeyine sahiptir. İmipenem için ise VIM-1 ve VIM-2'nin  $K_m$  değerleri sırasıyla  $1,5\mu M$  ve  $10\mu M$ ' dir. Yapısal olarak benzer olan enzimlerin farklı kinetik değerler göstermesi araştırmacıları beta laktam substratlarına bağlanma ve hidrolize etmede metallo-beta-laktamazların katalitik mekanizmasını araştırmaya yöneltmiştir. Örnek olarak, Docquier ve arkadaşları, bu önemli kinetik farklılıkların aktif bölge ya da yakınındaki 224'üncü pozisyondaki histidin/tyrozin ve 228'inci pozisyondaki serine/arjinin amino asit (substitution)'lerinden kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir (69).

### 1.5.2. Kromozomal olarak kodlanmış MBL'lar

Bu enzimleri sahip çoğu bakteri, genellikle beta laktam antibiyotiklere dirençlidir ya da direnç kazanabilir. Kromozomal olarak kodlanmış MBL'lerin önemli özellikleri indüklenebilir özellikte olmalarıdır. Çoğunlukla doğada bulunan bazı bakterilerde, aynı zamanda MBL enzimi de bulunmaktadır. *S. maltophilia* ve *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*) dışında bu bakterilerin çoğu fırsatçı patojenler olup nadiren ciddi infeksiyonlara neden olur. *B. cereus* (*BC2*), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (*L1*), *A. hydrophilia* (*CphA*), *C. meningosepticum* (*BlaB* ya da *GOB-1*), *C. indologenes* (*IND-1*), *L. gormannii* (*FEZ-1*), *Caulobacter crescentus* (*C. crescentus*) (*Mbl1 B*), *Myroides spp* (*TUS-1*, *MUS-1*), *Janthinobacterium lividium* (*J. lividium*) (*THIN-B*), *Flavobacterium johnsoniae* (*F. johnsoniae*) (*JOHN-1*) ve *Serratia*



*fonticola* (*S. fonticola*) (*SFH-1*) kromozomal olarak MBL kodlayan bakteriler arasında sayılabilir (70-81). Kromozomal kökenli bu enzimler genellikle serin beta laktamaz enzimleri ile bir arada bulunurlar. Örneğin; *A. hydrophilia* ve *Aeromonas veronii biovar sobia*, 3 çeşit beta laktamaz enzimini üretirler; bunlar penisilinaz, sefalosporinaz ve bir MBL enzimidir. Ya da beta laktam antibiyotik tedavisi sırasında *S. maltophilia*'daki indüklenbilir L1 metallo-beta-laktamaz enzimi ile birlikte klas A kromozomal enzim L2 de sentezlenmektedir. Bu derepresyon olayı genellikle in vivo beta laktam tedavisi altında iken  $10^{-5}$  ile  $10^{-7}$ 'de 1 sıklıkta oluşabilir (82).

Genellikle kromozomal olarak tanımlanan *Bacteroides spp.* ile ilgili bir grup MBL geni aslında aktarılabilir özelliktedir. *B. fragilis* diğer anaerobik bakterilerle karşılaştırıldığında, potansiyel olarak CfiA ya da bazen CcrA isimli MBL üretebilmesi nedeniyle, beta laktamlara dirençlidir. CfiA MBL ilk olarak 1990 yılında geni genetik olarak tanımlanmış ve bu gen kataliz etme mekanizması ve yapı-fonksiyon özellikleri bakımından en yoğun çalışılanlardan birisi olmuştur. Çalışmalar birçok ülkede, *B. fragilis*'in yaklaşık % 2-4 suşunda sessiz cfiA geni bulunduğunu göstermiştir (83, 84).

### 1.5.3. MBL'ların aktarılmasında kullanılan genetik araçlar

Kullanımının artmasıyla ilişkili olarak geniş spektrumlu sefalosporinlerin veya karbapenemlerin direncine neden olan metallo-beta-laktamaz enzimi taşıyan genlerin yayıldığı düşünülmektedir (85, 86). Klas 1 integronlar içindeki gen kasetlerinde kromozomal olarak kodlanan metallo-beta-laktamazlar dışındaki diğer metallo-beta-laktamaz enzimlerini kodlayan genler bulunurlar (87, 88). Klas 3 integronlar içinde de IPM enzimleri yer alabilir (89).

İntegronlar; biri integronda biri gen kasetinde 2 DNA bölgesi arasında, bölgeye özel rekombinasyon olaylarında gen kasetlerini elde etme yeteneğine sahiptirler. İntegronlar, 5' korunmuş bölgesi, 3' korunmuş bölgesi ve değişken bölgeden oluşur. 5' bölgesinde integrase genini (*intI*), bitişik rekombinasyon bölgesini (*attI*) ve değişken bölgede elde edilen gen kasetinin ekspresyonunu başlatan bir promoter (tetikleyici) içerir. 3' korunmuş bölgesinde ise sulfonamidlere ve antiseptiklere direnç gelişimine neden olan *sul* ve *qac* geni bulunmaktadır. Gen

kasetleri, yaklaşık 1 kb boyutunda, tek bir gen ve 59 baz element adı verilen rekombinasyon bölgesini içeren, küçük dairesel, DNA parçalarından oluşmaktadır (90). Aminoglikozid grubu antibiyotikleri kodlayan gen olan *aacA4* geni, MBL enzimini kodlayan gen kasetleri yanında genellikle bulunmaktadır. Böylece beta laktam antibiyotiklere ve kanamisin, neomisin, amikasin ve streptomisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine de direnç gelişimi gözlenmektedir (91). Bir integrondan diğerine serbestçe dolaşabilen aminoglikozid ve beta laktam direnç genlerini taşıyan gen kasetleri, bir organizmadan diğerine kendi başlarına hareket edemezler ve plasmidler ve transpozonlar gibi başka genetik elemanların yardımına ihtiyaç duyarlar (90). Metallo-beta-laktamaz enzim genlerini taşıyan integronların bakteriler arası yayılımından sorumlu olan genetik elemanlar transpozonlardır. 2003 yılında İtalya’da bir *P. aeruginosa* izolatında blaIMP-13 MBL enzimi ve bu enzimi kodlayan geni taşıyan Tn5051-tip transpozona gömülü integron rapor edilmiştir. Polonya’da izole edilen bir *P. aeruginosa*’da ise aynı noktada blaIMP-13 ve blaVIM-2 enzim genlerini taşıyan integronun transpozonda taşındığı ve her iki taraftaki transpozonların *tnpR* genlerinin aynı olduğu saptanmıştır. Bu bulgular transpozonların klas 1 integronların yayılımından sorumlu olduğunu düşündürmüştür. Bununla birlikte bütün MBL genlerinin integronlar ya da transpozonlarla ilişkili olmadığına dair raporlar da vardır (92).

#### **1.5.4. Aktarılabılır MBL’ler**

##### **1.5.4.1. IMP tipi metallo-beta-laktamazlar**

İlk olarak 1988 yılında Japonya’da *P. aeruginosa* suşunda GN 17203’ün bulunmasıyla konjugatif bir plazmidle taşınan metallo-beta-laktamaz geni tanımlanmıştır (93). Bu izolatın imipenem MIC değeri 50 µg/ml olarak tesbit edilmiş ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere de (örneğin seftazidim MIC >400 µg/ml) dirençli olduğu bildirilmiştir. 1991 yılında yani üç yıl sonra Japonya Okazaki’deki Aichi Hastanesinde üriner sistem infeksiyonundan izole edilen *S. marcescens* Tn9106 suşunda birebir aynı gen bulunmuştur (94). Daha sonra Japonya’nın çeşitli bölgelerinden aynı geni taşıyan farklı izolatlar bildirilmiştir. Saptanan tüm enzimlerin aynı aminoasit yapısına sahip olduğu belirlenmiş ve beta laktam ajanlarla birlikte imipenemi hidrolize etme özelliğinden dolayı bu enzime

IMP-1 adı verilmiştir. Bu IMP-1 enzimi klas 3 integron üzerinde ve 120 kb (kilobaz çifti) büyüklüğünde bir plazmidde bulunur (89).

Japonya'da *Shigella flexneri* (*S. flexneri*), *S. marcescens*, *P. aeruginosa* ve *Alcaligenes spp* izolatlarında metallo-beta-laktamaz enzimi varlığı araştırılırken IMP-1'in 3 minör varyantı, IMP-3, IMP-6 ve IMP-10 tanımlanmıştır. Genetik ve kinetik çalışmalarda 169'uncu pozisyonadaki serin yerine glisin geçmesinin penisiline karşı aktivitede bir azalmaya yol açtığı belirlenmiştir. IMP-6'da izlenen bu aynı amino asit değişikliği; sadece penisilin G ve piperaciline karşı düşük aktivite göstermemiş, aynı zamanda, IMP-1'in aksine; imipenemle kıyaslandığında daha yüksek seviyede meropenem hidrolizi göstermiştir (95).

Taşınabilir metallo-beta-laktamaz genlerinin yalnızca Japonya'nın problemi olmadığı, İtalya'da 1997'de blaIMP-2'nin ve Portekiz'de 1998'de blaIMP-5'in bulunması ile görülmüştür (96, 97). Daha sonraki çalışmalarda tüm dünyada metallo-beta-laktamaz enzimi taşıyan bakterilere rastlanmakla birlikte, Japonya'daki ilk tesbit edilen taşınabilir metallo-beta-laktamaz enzim geninin diğer ülkelere Japonya'dan yayıldığını kanıtlayacak çok az veri vardır. Hatta Avrupa'daki IMP'ler ve Güneydoğu Asya'dakiler arasında farklar olması IMP allellerinin Japonya'dan dünyaya yayıldığı görüşünü çürütmüştür. Daha çok bu allellerin lokal belirlediği görüşü ileri sürülebilir. IMP tipi metallo-beta-laktamazlar tablo 4'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.** IMP tipi metallo-beta-laktamazlar (95)

<b>IMP tipi beta-laktamazlar</b>		
<b>Beta-laktamazlar</b>	<b>Bulunduğu bakteri</b>	<b>Bildirilen ülke</b>
<b>IMP-1</b>	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Japonya
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya
	<i>Pseudomonas putida</i>	Japonya
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Japonya
<b>IMP-2</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	İtalya
<b>IMP-3</b>	<i>Shigella flexneri</i>	Japonya
<b>IMP-4</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Hong-Kong
<b>IMP-5</b>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portekiz
<b>IMP-6</b>	<i>Serratia marcescens</i>	Japonya
<b>IMP-7</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Kanada/Malezya
<b>IMP-8</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Tayvan
<b>IMP-9</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Çin
<b>IMP-10</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Japonya
	<i>Alcaligenes xylosoxidans</i>	Japonya

#### 1.5.4.2.VIM-tip metallo-beta-laktamazlar

Veronese imipenemaz (VIM) tipi enzimler kazanılan MBL'ların ikinci dominant grubudur. VIM-1, Verona İtalya'da bir *P. aeruginosa* izolatında ilk olarak 1997 yılında tespit edilerek tanımlanmıştır. Bu izolatın imipenem için MIC değeri >128µg/ml iken piperasilin, seftazidim, imipenem ve aztreonam gibi beta laktam ilaçlara da dirençli bulunmuştur. VIM-1 (Veronese imipenemaz)'in diğer metallo enzimlerle yapısal benzerlikler gösterdiği görülmüştür. BlaIMP genlerinde bulunduğu gibi, blaVIM-1 geni de klas 1 integronlara gen kaseti olarak bütünleşmiştir. Bu integron blaVIM-1 gen kasetine ek olarak, klas 1 integronlarda tipik olan integrase geni ve aminoglikozidlere direnci kodlayan aacA4 gen kasetini taşır (98). Ek olarak, VIM-1 İtalya'da nozokomiyal infeksiyon kaynağı olup, *Pseudomonas putida* (*P. putida*) izolatlarında da tespit edilmesi çevresel izolatların MBL'ların kaynağı ya da en azından vektörleri olduğu görüşünü desteklemiştir (88). VIM-1 ayrıca Yunanistan'da *E. coli* ve birkaç *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiştir (99). BlaVIM-2 ilk olarak güney Fransa'da 1996 yılında nötropenik bir hastanın kan kültüründe *P. aeruginosa* izolatında identifiye edilmiştir (100). Bu izolat, seftazidim, sefepim ve imipenem gibi birçok beta laktama dirençli, ama aztreonama duyarlı bulunmuştur. VIM-2 (% 90 amino asit aynı)'nin VIM-1'e çok benzediği ve bir gen kaseti tarafından kodlandığı bulunmuştur. blaVIM-2 pozitif klas1 integronlarda tespit edilen tek direnç geni bu izolatta tesbit edilmiştir (101). Daha sonra, Marsilya Fransa'da 1995-1999 yılları arasında 10 ayrı VIM-2 pozitif *P. aeruginosa* izolatı identifiye edilmiştir. Bu izolatlar aynı genotipik paterne sahip bulunurken, blaVIM-2 geni taşıyan klas 1 integronlar büyüklük ve yapı bakımından değişiklik göstermiştir (102).

VIM-2 üreten *P. aeruginosa* ayrıca, Japonya, Güney Kore, Portekiz, İspanya, Polonya, Hırvatistan, Şili, Venezueluella, Arjantin, Belçika ve Amerika Birleşik Devletlerinde rapor edilmiştir (103-109).

Tayvan'da yakın zamanda *P. aeruginosa* izolatlarında VIM-2 ve VIM serisinin yeni ortaya çıkan varyantı VIM-3 identifiye edilmiştir. VIM-3'ün amino asit yapısı VIM-2'den 2 amino asit oynamayla değişir. blaVIM-3 geninin kromozom üzerindeki yeri fark edilmesine rağmen kesin genetik yapısı hala bilinmemektedir. VIM-4, VIM-2 ve VIM-3 te olduğu gibi, VIM-1'den sadece bir amino asit

değişikliğiyle (Ser175Arg) ayrılır. VIM-4 Yunanistan Larissa'da bir *P. aeruginosa* izolatında rapor edilmiştir. İlginç olarak, Yunanistan'dan transfer edilen İsveç'teki bir hastada karbapenem dirençli VIM-4 *P. aeruginosa* izolatı tanımlanmıştır. VIM-1'den 5 amino asit değişikliği ile ayrılan VIM-5 ise, ilk olarak Türkiye Ankara'da *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* izolatlarında izole edilmiştir (110). blaVIM-5'in tanımlanması *P. aeruginosa* izolatı aztreonam dahil bütün beta laktamlara dirençli bulunmuştur (111, 112).

Beta laktamaz VIM-6, Singapur'da iki *P. putida* izolatında tanımlanmıştır. Bu izolatların imipenem ve meropenem MIC değerleri  $>32\mu\text{g/ml}$ , seftazidim için  $>256\mu\text{g/ml}$  ve aztreonam için  $128\mu\text{g/ml}$  olarak bulunmuş ve beta laktamlara yüksek derecede dirençli oldukları saptanmıştır. VIM-6'nın VIM-2'den iki amino asit değişikliği (59. pozisyonda glutamin/arjinin ve 165. pozisyonda asparajin/serin) ve VIM-3'den sadece bir amino asit değişikliği ile ayrıldığı görülmüştür. Tam olarak aydınlatılan en yeni VIM-tipi beta laktamaz olan VIM-7, Houston Teksas'tan bir karbapenem dirençli *P. aeruginosa* izolatında tanımlanmıştır. VIM-1 ile %77 ve VIM-2 ile % 74 benzerliği olup, VIM-tipi beta laktamazlar arasında yeni bir üçüncü subgrup oluşturur. blaVIM-7 integron kökenli gibi görülmektedir. Aztreonam dahil bütün beta laktamlara ve polimiksin B hariç diğer antibiyotiklere dirençli olan klinik bir izolattan tanımlanmıştır. VIM-1 ve VIM-2 birkaç değişik Enterobakter türlerinden tanımlanmış olsa da, bu enzimlerin bilinen en önemli rezervuarı *P. aeruginosa*'dır. Raporlar VIM-tipi beta laktamazların farklı coğrafi alanlardan tanımlanmasını işaret etse de, bu gibi enzimlerin belirli bölgelerde yayılımını değerlendirmek üzere bazı çalışmalar yapılmıştır.

Yeni blaVIM genlerinin ilki Kolombiya'da *P. aeruginosa*'dan izole edilen blaVIM-8'dir. blaVIM-8'in bulunmasıyla Güney Amerika'da sayıları hızla artan blaVIM genlerine bir yenisi eklenmiş oldu. Son olarak, İngiltere'den blaVIM-9 ve blaVIM-10, Arjantin ve İtalya'dan blaVIM-11 bildirilmiştir (113). VIM tipi beta laktamazlar tablo 5'te gösterilmiştir.

**Tablo 5.** VIM tipi beta laktamazlar

VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	İtalya
	<i>A. baumannii</i>	İtalya
VIM-2	<i>S. marcessens</i>	Fransa
	<i>A. baumannii</i>	Kore
	<i>P. aeruginosa</i>	Kore
	<i>P. aeruginosa</i>	Yunanistan
	<i>P. putida</i>	Kore
	<i>E. cloace</i>	Kore
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	Tayvan
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	Polonya
VIM-5	<i>P. aeruginosa</i>	Türkiye, Portekiz
VIM-6	<i>P. putida</i>	Singapur
VIM-7	<i>P. aeruginosa</i>	Amerika Birleşik Devletleri

#### 1.5.4.3. SPM-1 metallo-beta-laktamaz

Brezilya Sao Paulo’da 1997 yılında bir *P. aeruginosa* klinik izolatu, SENTRY araştırma programı parçası olarak tanımlanmış ve blaSPM-1 (Sao Paulo MBL) olarak adlandırılan yeni bir gen taşıdığı gösterilmiştir (100). İzolatın, kolistin dışında standart bütün Gram negatif bakterilere etkili antibiyotiklere dirençli olduğu gösterilmiştir. SPM-1, beta laktamlardan penisilin, ampisilin, piperasilin, karbenisilin, azlosilin ve sefalotini hızlı hidrolize etme yeteneğine sahipken, enzimin sefalosporinlere afinitesi daha fazladır. SPM-1’in dizilimi diğer MBL’lerle karşılaştırıldığında, en fazla benzerlik IMP-1 (%35.5) ile bulunmaktadır. Bununla birlikte IMP ve VIM benzeri enzimler gibi transpozon yada integronlar içinde yer almamaktadır (114, 115) Ayrıca, IMP-1 ve VIM-1 gibi kompetitif inhibitör olarak davranan klavulanik asit ya da aztreonamı hidrolize etmez (116).

#### 1.5.4.4. GIM-1 metallo-beta-laktamaz

Almanya Dusseldorf’da farklı tıp merkezlerinden farklı hastalardan 2002 yılında beş *P. aeruginosa* izolatu elde edilmiş ve GIM-1 diye adlandırılan yeni bir klas B beta laktamaz içerdiği gösterilmiştir (German imipenemase). IMP ve VIM benzeri enzimlerden tamamen farklı olduğu belirlenmiştir. Bu isolatlar sadece polimiksin B’ye duyarlı bulunmuştur. Pulsed-field jel elektroforez analizi ile beş *P.*

*aeruginosa* izolatu ayırt edilememiştir. GIM-1 enziminin amino asit dizilimi IMP-6 (% 43.5), IMP-1(% 43.1) ve IMP-4 (% 43.1) ile benzerlik göstermektedir. GIM-1, VIM enzimleri ile VIM-7 (% 31,2), VIM-1, VIM-4 ve VIM-5 (% 28,8) ve SPM-1 (% 28.0) ile de benzerlik göstermektedir.

Metallo-beta-laktamazların çoğunda olduğu gibi (SPM-1 enzimi dışında) bla GIM-1, 45 kb'lık küçük bir plazmidde taşınan klas 1 integronda bulunur. Bu integron içerisinde ayrıca iki aminoglikozid direnç geni (aaaA4 ve aadA1) ve bir beta laktamaz direnç geni (blaOXA-2) gibi üç tane daha direnç gen kaseti de bulunmaktadır ( 117).

### **1.5.5. Deneysel metallo-beta-laktamaz enzim inhibitörleri**

Beta laktam/beta laktamaz inhibitör kombinasyonlarının kullanılması metallo-beta-laktamaz enzimi üreten bakteriler ile oluşan infeksiyonların tedavisinde etkili olmamaktadır. Bilinen bütün serin beta laktamaz inhibitör ve inaktivatörleri metallo-beta-laktamaz enzimlerine karşı etkisizdirler. Bütün metallo-beta-laktamazların inaktivatörü olarak EDTA, 10-phenanthroline ve dipikolinik asit rapor edilmiştir. Metallo-beta-laktamaz enzimlerinin yapılarındaki aktif bölgelerin farklılığından dolayı bütün MBL enzimlerine etkili olabilecek tek bir inhibitörün bulunması oldukça güçtür. Beta laktamaz inhibitörü olan klavulonik asit düşük toksisiteye sahip ve memeli hücreleri ile etkileşmezken MBL enzim inhibitörleri ile ilgili diğer önemli sorunda MBL'lerin aktif bölge yapılarının memelilerdeki hücresel fonksiyonlarda yaşamsal önemi olan enzimlerle benzer özellikte olmasıdır. Örneğin 2 oxoaldehidlerin katabolizması için gerekli ve bir tiyoesteraz olan gliosalaz-2 MBL enzimleri ile benzer protein katlantılarına sahiptir ve çinko bağlanma bölgeleri ile yapısal benzerlik göstermektedir (118, 119).

Metallo-beta-laktamaz inhibitörü olarak, yapısal olarak farklı çok çeşitli bileşikler incelenmiş bunlarla ilgili çeşitli çalışmalar yapılmıştır; bunlar Tiyoester türevleri, triflorometil alkoller, ketonlar, tiyoller, sülfonil hidrozonlar, trisiklik doğal ürünler, süksinik asit türevleri, bifenil tetrazoller, sisteinilpeptidler, merkaptokarboksilatlar, 1-β-metilkarbapenem, sefotetan, tiyoksi-sefalosporinler ve penisilin türevleri sayılabilir (120-122).

Çalışmalarda incelenen bileşikler farklı MBL enzimlerine karşı denendiği için bileşiklerin birbirleri ile karşılaştırılması oldukça zordur. *P. aeruginosa*'da bulunan IPM-1 enzimine karşı 1-β-metilkarbapenem, bazı tiyoester türevleri ve penisinat sülfon gibi bileşikler etkili bulunmuş ama çalışılan diğer bileşiklerin MBL'ler üzerine etkili olmadığı bulunmuştur (123).

Beta laktam yapısı çevresinde sentez edilen ve yeni geliştirilen bu bileşikler farmakokinetik açıdan daha umut verici olabilirler. Tedavi edici olarak, klinikte kullanılabilen beta laktamlar (örneğin aztreonam), kompetatif inhibisyona bağlı potansiyel bir MBL inhibitörü olduğu için ayrıca önerilebilir (124, 125).

### **1.6. MBL'ların Tespiti**

Bakterilerde GSBL'nin erken belirlenmesi kadar MBL enzim genlerinin tesbit edilmesi de önem arzeder. MBL enzimi taşıyan bakterilerin tanımlanmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında çeşitli fenotipik yöntemler kullanılmaktadır. Fakat bugüne kadar *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'nin MBL direnç geni taşıdığını tesbit eden standart test kriteri ve fenotipik yöntem belirlenememiştir. Örneğin; bazı *Acinetobacter spp* türleri ve *Enterobacteriaceae*'ların çoğu MBL enzimi taşıdığı halde 1 µg/ml nin altındaki imipenem MIC değerleri ile duyarlı olduğu görülecektir. Bu sebeple MBL belirlenmesindeki tarama plağı uygulamasında bakteri türü dikkate alınmalıdır. Mesela *Pseudomonas*'lar, *Enterobacteriaceae*'lardan daha büyük karbapenem MIC değerlerine sahiptir. ESBL üretmediği bilinen *Enterobacteriaceae*'larda MBL belirlenmesinde kullanılan tarama plağı EDTA'lı veya EDTA'sız seftazidim içermelidir. MBL enzimleri aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn<sup>+2</sup> iyonu bulunan enzimlerdir ve metal şelatörü olan EDTA ile inhibe olurlar. Uygulanan fenotipik yöntemler EDTA'nın MBL enzimini inhibe etme özelliğine dayanmaktadır (123, 126).

#### **1.6.1. Kombine disk sinerji testi**

Bu testte, plak içerisine yerleştirilen 2 imipenem/meropenem diskinden bir tanesine EDTA ilave edildikten sonraki inhibisyon zon çapı farkına göre değerlendirmenin yapıldığı testtir. MBL pozitif bakteri izolatu kabul edilebilmesi için EDTA solusyonunun eklendiği imipenem/EDTA, meropenem/EDTA diskinin



inhibisyon zonu tek başına imipenem diski zon çapından  $\geq 7$  mm büyük olması gerekir.

### **1.6.2. Çift disk sinerji testi**

Buradaki amaç; imipenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini belirleyip MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. Bu test imipenem/meropenem diski ve merkezinden 10 mm uzağına hazırlanan boş disk yerleştirilerek yapılır. Boş disk üzerine EDTA eklendikten sonra imipenem diski, inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru inhibisyon zonu oluşturması sinerjistik inhibisyon zonu olarak adlandırılır.

### **1.6.3. MBL E Test yöntemi**

Bir tarafında imipenem/meropenem diğer tarafında ise imipenem/meropenem ve EDTA bulunan test stribi kullanılmaktadır. İmipenem/meropenem MİK değerinin, EDTA'nın olduğu taraftaki MİK değerinden 8 kat yüksek ve üzerinde bir değer olması MBL E test pozitifliği olarak değerlendirilir.

### **1.6.4. Modifiye Hodge testi:**

Metallo-beta-laktamaz üreten bir bakteri ile imipenem/meropenem duyarlı bir bakterinin bir arada olduğunda imipenem/meropenem varlığında da üreyebilmesi esasına dayanmaktadır. Bu test penisilinaz üreten *N. gonorrhoeae* tesbitinde kullanılan Hodge testinin metallo-beta-laktamaz üretimini göstermek için *S. aureus* (ATCC 25923) yerine *E. coli* (ATCC 25922), penisilin diski yerinde imipenem/meropenem diski kullanılması ile modifiye edilmiş bir yöntemdir (126, 127).

### **1.6.5. Mikrodilüsyon test**

Migliavacca ve ark. (128) tarafından geliştirilmiş olan mikrodilüsyon MBL tarama testi basit, duyarlı ve yüksek özgüllüğe sahiptir. Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılmaya da uygundur. İmipenem MİK değeri mikrodilüsyon yöntemi ile ölçülür, sonra metal şelatörlerden EDTA ve fenantirolin eklenerek tekrar MİK değerine bakılır, 8 kat azalma pozitif olarak değerlendirilir.

### **1.6.6. Moleküler yöntemler**

Başlıca kullanılanlar moleküler yöntemler sırasıyla; blot hibridizasyon yöntemi, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), nükleotid sekans amflikasyon yöntemi, izoelektrik fokuslama yöntemi ve poliakrilamid jel elektroforezidir (129).

Metallo-beta-laktamaz'lar saptanırken kromojenik substrat nitrosefinli karşıt boyama jeli yardımıyla enzimin izoelektrik noktası tespit edilmiştir. MBL enziminin identifikasyonunda önerilmeyen bu yöntem birbirinden anlamlı şekilde farklı olan MBL'lerin izoelektrik noktaları hakkında yararlı bilgiler sağlamaktadır (130).

Özel spektrofotometrik cihazlar kullanılarak imipenem ve meropenem hidrolizini gösteren yöntem "altın standart" olarak tanımlanmıştır. Moleküler olmayan yöntemler arasında en önemlisi duyarlılığı en yüksek olan test bu testtir. Bu yöntem bakteriden saflaştırılarak elde edilen enzimin özel spektrofotometrik cihazlar kullanılarak imipenem ve meropenem hidrolizini göstermektedir. EDTA varlığında bu enzim aktivitesi inhibe olmaktadır.

Metallo-beta-laktamazların tesbit edilmesinde genotipik yöntemlerde kullanılabilir. Bilindiği gibi genotipik yöntemlerin fenotipik yöntemlere göre duyarlılığı daha yüksektir. Bakteride MBL geninin olup olmadığını PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi ile enzimi ve tipinde dahil olmak üzere saptamak mümkündür. MBL tesbit DNA probing kullanılarak da yapılabilir. Moleküler yöntemlerindeki altın standart ise klonlama ve sekans analizi yöntemleridir.

### **1.7. MBL Enzim Aktivitesi Gösteren Bakterilerle Oluşan İnfeksiyonların Tedavisi**

Metallo-beta-laktamazlardaki en önemli problem eşsiz geniş spektrumlu direnç profilleridir. Optimal tedavi protokolünü belirlemek için MBL enzimi pozitif izolatlarla olan insan infeksiyonlarıyla ilgili hiçbir geniş çalışma yapılmamıştır. Maalesef bu infeksiyonları tedavi etmek için uygun bir tedavi hala bilinmemektedir. Yeni antibakteriyel ajanlar yakın gelecekte bulunmazsa MBL enzim üreten izolatların yayılımı ölümcül sonuçlara yol açacak gibi gözükmektedir. Özellikle dirençli ciddi enfeksiyonlarda kolistinin kullanımı oldukça artmıştır (131-133). Tablo 6'da çeşitli vaka raporları ve çalışmaların değerlendirilmesi ile MBL aktivitesi

gösteren izolatlarla meydana gelen infeksiyonların tedavisinde seçenek olabilecek antibiyotikler gösterilmiştir.

**Tablo 6.** MBL üreten izolatların olası tedavi seçenekleri

<b>Antimikrobiyal ajanlar</b>	<b>Yorum</b>
<b>Karbapenemler</b>	Önerilen tek rapordan başka klinik veriler yoktur. Yakınozamanda yayınlanan tek bir hayvan deneyi raporu vardır. Karbapenemlerin kullanımları ile ilgili veriler: karbapenem tedavisi sonucunda karbapenem dirençli mutantların ortaya çıkması. Bu MBL üreten izolatlarda çeşitli karbapenemlerin öldürücü sonuçlarının olabileceğine ilişkin invitro veriler olmasına rağmen bütün karbapenemlere uygulanabilir.
<b>Aztreonam</b>	İnvitro veriler destekleyecektir ama bunlarla ilgili klinik veriler sınırlıdır. Hayvan modelleri ile ilgili çelişkili sonuçlar rapor edilmiştir. MBL üreten izolatlarda aztreonamın diğer direnç mekanizmalarından da etkilenebileceği söz edilmiştir. Kombinasyon tedavisinde kullanılabilir. Bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.
<b>Piperasilin/tazobaktam</b>	Bazı <i>P. aeruginosa</i> izolatlarında kullanımını iv vitro veriler destekleyecektir ama bununla ilgili klinik veriler yoktur.
<b>Florokinolonlar ve Aminoglikozidler</b>	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik veriler destekleyecektir. Kombinasyon tedavilerinde kullanılabilir. Bu konuda çalışmalara ihtiyaç vardır.
<b>Kolistin</b>	Tedavide seçilebilecek tek ilaçtır. Direnç rapor edilmemiştir ve bu ilaçla ilgili laboratuvar çalışması yapılmalıdır.
<b>Kolistin+Rifampisin</b>	Bu kombinasyon invitro verilerle desteklenmektedir.
<b>Tetrasiklin ve Glisiklinler</b>	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik verilerle desteklenebilir. Tigesiklinle ilgili invitro çalışmalarda MBL üreten Enterobakter ve Acinetobacter türlerinde etkili olabileceği ileri sürülmüştür.
<b>Fosfomisin</b>	Bunların kullanımını suşların duyarlılığı ile ilgili klinik verilerle desteklenebilir. Diğer bileşiklerle birlikte kullanılabilir.

Bir hastanede MBL pozitif bir izolatın tanımlanması sadece terapötik bir problem değil aynı zamanda infeksiyon kontrol komitesini de ciddi şekilde ilgilendiren bir durumdur. MBL üreten bakterilerle kolonizasyonu tespit etmek hastaları klinik servislere, özellikle yoğun bakım ünitelerine ve onkoloji ünitelerine kabul ederken önlem alınması açısından yararlı olacaktır. Çoklu ilaç direncine sahip bu izolatların erken tespiti yayılımı önleyebilir ve birinci ve ikinci derece tedavileri sağlayabilir. Laboratuvar, infeksiyon kontrol komitesini acilen bilgilendirmeli, hasta yüksek risk grubunda kabul edilmeli ve uygun izolasyon ölçütleri uygulanmalıdır. Hastanın tıbbi formları, hasta ile temas geçen klinisyenleri ve diğer tıbbi bakım

alışanlarını bilgilendirecek şekilde, infeksiyonun yüksek risk grubundan olduğunu belirtir şekilde düzenlenmelidir (134). En önemlisi antibiyotik kullanımının kısıtlanmasına çalışılmalıdır.

## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Çalışmada kullanılan bakteriler**

Çalışmaya Ağustos 2011 ile Ağustos 2012 tarihleri arasında, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarına gelen rutin örneklerden meropenem dirençli 50 adet Gram negatif non fermentatif örnek dahil edilmiştir.

Kliniklerden gelen örnekler konvansiyonel biyokimyasal testler kullanılarak tiplendirilmiştir. Tiplendirilen örnekler BD Phoenix Tam Otomatize İdentifikasyon Cihazı ile doğrulanmıştır.

### **2.2. Antibiyotik diskleri**

Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılan duyarlılık testleri için ticari olarak elde edilen meropenem (10µg) (Oxoid) diskleri kullanılmıştır.

### **2.3. Mueller-Hinton agar besiyeri**

Mueller-Hinton agar besiyeri (Plasmatec) 38 g'ı 1000 ml'lik distile su içerisinde çözdürüldükten sonra 1 atmosfer basınç altında 121°C de 15 dakika otoklavlanmıştır. Uygun ısıda soğutularak 90 mm çaplı petri kutularına 4 mm kalınlığında dökülmüştür. Plaklar kullanılmaya kadar +4 °C'de buzdolabında saklandı. Bu hazırlanan besiyeri disk difüzyon duyarlılık testlerinde, MBL fenotipik test yöntemleri olan kombine disk testi, Modifiye Hodge testi, çift disk sinerji testi ve MBL E test yöntemleri için kullanılmıştır.

### **2.4. EDTA (Etilendiamintetraasetik asit ) Hazırlanışı**

Ticari olarak hazır elde edilen EDTA tozu (Sigma) ile 0,5 M EDTA solüsyonu hazırlanmıştır. Bunun için 18,61 g disodium EDTA.H<sub>2</sub>O 100 ml'lik steril distile suda çözülerek pH 8.0'e ayarlanmıştır. pH ayarlanırken NaOH kullanıldı. Metallo-beta-laktamaz inhibitörü olarak kombine disk testi ve çift disk sinerji testlerinde kullanılmıştır (135).

## 2.5. MBL E Test stripleri

Ticari olarak hazır elde edilen, bir tarafında 0.125-8 µg/ml meropenem, diğer tarafında ise sabit konsantrasyonda EDTA ile birlikte 0.032-2 µg/ml meropenem içeren MBL E test şeritleri (Biomerieux) kullanılmıştır.

## 2.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI kriterlerine göre Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapıp değerlendirilmiştir. 18-20 saatlik taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakteri kolonileri deneylerde kullanılmıştır. Bu kolonilerden elde edilen bakterilerden 0.5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlanarak steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. En çok 30 dakika içerisinde diskler yerleştirilerek ve 35°C-37°C lik etüvde 18-20 saat inkübe edilmiştir. Antibiyogramlar 18-20 saatlik inkübasyondan sonra zon çapları CLSI (Ocak 2012) standartlarına göre ölçülerek dirençlilik, orta derecede duyarlılık ve duyarlılık durumları kaydedilmiştir. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için meropenem (10µg) (Oxoid) disk difüzyon sınır değerleri tablo 2'ye göre değerlendirilmiştir. Sonuçlar BD Phoenix Tam Otomatize İdentifikasyon cihazı ile doğrulanmıştır.

Kontrol suşu olarak meropeneme duyarlı *E. coli* "American Type Culture Collection" (ATCC) ATCC 25922 ve *P. aeruginosa* ATCC 27853 kullanılmıştır. *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* bakterilerinin antibiyotik duyarlılık testleri ve MBL enzimini tesbit etmek için kullanılan fenotipik testler aşağıda belirtilen gereçler ve yöntemler kullanılarak yapılmıştır.

## 2.7. MBL Tesbitinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler

### 2.7.1. Kombine Disk Testi

Taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. Plak içerisine 2 tane meropenem (10µg) diski yerleştirilmiştir. Diskler arası uzaklık 22 mm olacak şekilde ayarlanmıştır. Meropenem disklerinden bir tanesinin üzerine daha önceden hazırlanmış olduğumuz

0,5 M'lık EDTA solüsyonundan 10 µl pipetle eklenmiştir. Plak 35°C- 37°C lik etüvde 18-20 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda inhibisyon zon çapları ölçülmüştür. EDTA solüsyonunun eklendiği meropenem/EDTA diskinin inhibisyon zonu tek başına meropenem diski zon çapından  $\geq 7$  mm büyük ise MBL pozitif bakteri izolatu olarak kaydedilmiştir (126, 127).

### **2.7.2. Çift Disk Sinerji Testi**

Çift disk sinerji testinde amaç meropenem inhibisyon zonunun EDTA varlığında genişleyip genişlemediğini tesbit ederek MBL pozitif bakteri izolatlarını tanımlamaktır. Bunun için taze kültür pasajlarından saf olarak elde edilen bakterilerin 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. Plak üzerine meropenem (10µg) diski yerleştirilmiştir. Meropenem diskinin merkezinden 10 mm uzağına daha önce hazırlanan boş disk yerleştirilmiştir. Boş disk üzerine 0,5 M EDTA solüsyonundan 10µl eklenmiştir. Test sonuçları plaklar 35°C-37°C lik etüvde 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirmeye alınmıştır. İnkübasyon sonrasında meropenem diski inhibisyon zonunun EDTA eklenmiş boş diske doğru genişlemesi sinerjistik inhibisyon zonu olarak değerlendirilmiştir. Bu genişlemenin görüldüğü bakteri izolatları MBL üreten pozitif suş olarak kaydedilmiştir (126, 127).

### **2.7.3. Modifiye Hodge Testi**

Modifiye Hodge testinde meropeneme duyarlı olan *E. coli* ATCC 25922 standart suşu taze pasajlarından elde edildikten sonra 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonlar Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. Plağın ortasına meropenem (10µg ) diski yerleştirilmiştir. Diskin kenarından plağın dört tarafına merkezden perifer doğru düz çizgi şeklinde test edilecek olan bakteriler ekilmiştir. 18-20 saat inkübe edildikten sonra değerlendirilmiştir. Test sonuçları meropeneme duyarlı olan *E. coli* ATCC 25922 suşunun duyarlılık zon çapının çizgi ekimi yapılan bakteri taraflarında yonca yaprağı şeklinde bozulması ve bu bölgede *E. coli* üremesi metallo-beta-laktamaz üretimi yönünde pozitif test sonucu olarak değerlendirilmiştir (126, 127).

#### **2.7.4. MBL E Test**

Test edilecek bakteri izolatlarının 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonu steril eküvyon ile önceden hazırlanan Mueller Hinton agar plaklarına yayılmıştır. MBL E Test stripleri plak üzerine yerleştirilmiştir. Etüvde 18-20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirilmiştir. Meropenem-EDTA MİK değeri ve meropenem MİK değeri not edilmiştir. Üretici firmanın önerisi doğrultusunda MP/MP-EDTA MİK değerleri oranlandığında 8 ve üzerinde bir değer elde edilmesi MBL üreten bakteri izolatı olarak değerlendirilmiştir (126, 127).

Uygulanan iki test arasında sonuçların uyum oranı her iki testle pozitif ve her iki testle negatif bulunan izolat sayısının toplamının, toplam çalışılan izolat sayısına bölünmesiyle hesaplanmıştır (136).



### 3. BULGULAR

Çalışmaya Ağustos 2011 ile Ağustos 2012 tarihleri arasında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nin çeşitli servislerinden Merkez Laboratuvarına gönderilen rutin örneklerden izole edilen meropeneme dirençli 40 adet *A. baumannii* ve 10 adet *P. aeruginosa* izolatı olmak üzere toplam 50 adet NFGN bakteri suşu alınmıştır.

İzolatların elde edildiği örneklerin dağılımı kliniklere göre farklılık göstermiştir. Yenidoğan yoğun bakım kliniğinden steril vücut sıvısı, cerrahi ve dahili kliniklerden ise yara kültürü örneklerinin çoğunlukta olduğu görülmüştür. Örneklerin servislere göre dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Örneklerin kliniklere göre dağılımı

Örneğin geldiği klinik	Yara n (%)	Steril n (%)	İdrar n (%)	Kan n (%)	Diğer n (%)	TOPLAM n=50
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Kliniği	19(%38)	-	-	-	-	19(%38)
Yenidoğan Yoğun Bakım Kliniği	-	7(%14)	1(%2)	1(%2)	1(%2)	10(%20)
Dahili servisler	2(%4)	1(%2)	4(%8)	2(%4)	1(%2)	10(%20)
Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği	6(%12)	-	-	-	-	6(%12)
Diğer cerrahi servisler	3(%6)	-	2(%4)	-	-	5(%10)
TOPLAM	30(%60)	8(%16)	7(%14)	3(%6)	2(%4)	50(%100)

*A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın bazı antibiyotiklere direnç oranları tablo 8'de gösterilmiştir.

**Tablo 8.** *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*'nın bazı antibiyotiklere direnç oranları

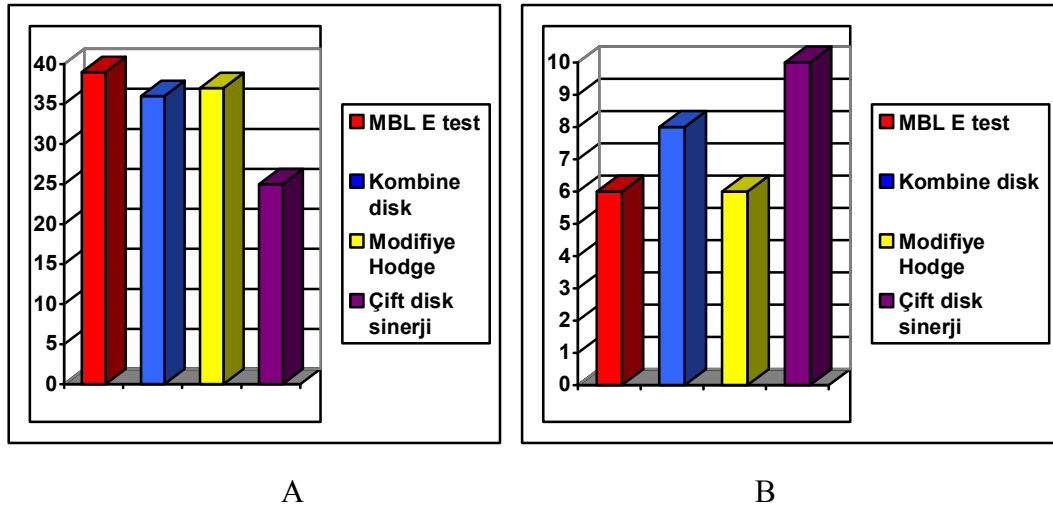
Patojenin adı n(%)	CAZ	FEP	IPM	CİP	AK	TZP	ATM	CO
<i>A.baumannii</i> n=40 (%)	40 (%100)	40 (%100)	40 (%100)	40 (%100)	39 (%97.5)	40 (%100)	40 (%100)	0 (%0)
<i>P.aeruginosa</i> n=10 (%)	10 (%100)	8 (%80)	10 (%100)	9 (%90)	7 (%70)	10 (%100)	9 (%90)	1 (%10)

CAZ: seftazidim, FEP: sefepim, CİP: siprofloksasin, AK: amikasin, TZP: piperasilin/tazobaktam, ATM: aztreonam, CO: colistin

Klinik örneklerden izole edilen mikroorganizmaların MBL üretimini araştırmak için uygulanan fenotipik tesbit yöntemlerinden kombine disk sinerji testi, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testi ve MBL E test yöntemlerinin sonuçları Tablo 9’da ve şekil 1’de gösterilmiştir.

**Tablo 9.** Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*’daki MBL pozitifliği (%)

Fenotipik yöntem	<i>A. baumannii</i> (n=40)		<i>P. aeruginosa</i> (n=10)	
	MBL (+)	n (%)	MBL (+)	n (%)
Kombine disk sinerji testi	38	(%95)	8	(%80)
Çift disk sinerji testi	27	(%67.5)	10	(%100)
Modifiye Hodge testi	29	(%72.5)	6	(%60)
MBL E Test	39	(%97.5)	6	(%60)



**Şekil 1.** Fenotipik tesbit yöntemleri sonucunda *A. baumannii* ve *P. aeruginosa*’daki MBL pozitifliği (A. *A. baumannii*, B. *P. aeruginosa*)

*A. baumannii* ve *P. aeruginosa* için tüm fenotipik test sonuçlarının karşılaştırılması tablo 10 ve tablo 11’de yapılmıştır.

**Tablo 10.** Tüm fenotipik testlerin *A. baumannii* için karşılaştırılması

E Test	KDST	ÇDST	MHT	Adet	%
+	+	+	+	23	57.5
-	-	-	-	0	0
-	-	-	+	0	0
-	+	+	+	0	0
+	+	-	+	5	12.5
+	-	+	+	0	0
-	-	+	+	0	0
+	+	-	-	6	15
-	+	-	+	1	2.5
+	-	-	-	0	0
-	+	+	-	0	0
+	+	+	-	4	10
+	-	+	-	1	2.5
-	+	-	-	0	0
-	-	+	-	0	0

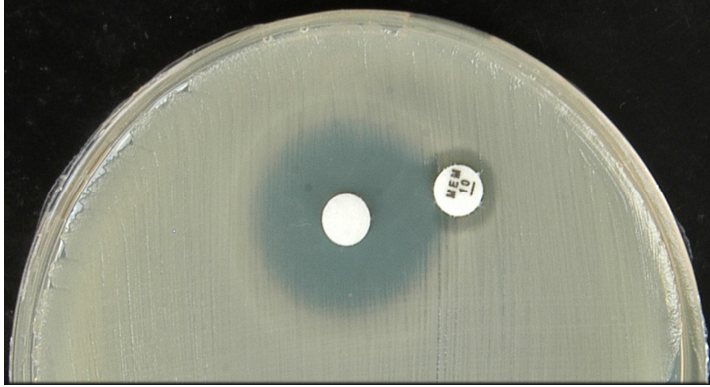
**Tablo 11.** Tüm fenotipik testlerin *P. aeruginosa* için karşılaştırılması

E Test	KDST	ÇDST	MHT	Adet	%
+	+	+	+	4	40
-	-	-	-	0	0
-	-	-	+	0	0
-	+	+	+	1	10
+	+	-	+	0	0
+	-	+	+	1	0
-	-	+	+	0	0
+	+	-	-	0	0
-	+	-	+	0	0
+	-	-	-	0	0
-	+	+	-	2	20
+	+	+	-	1	10
+	-	+	-	0	0
-	+	-	-	0	0
-	-	+	-	1	10

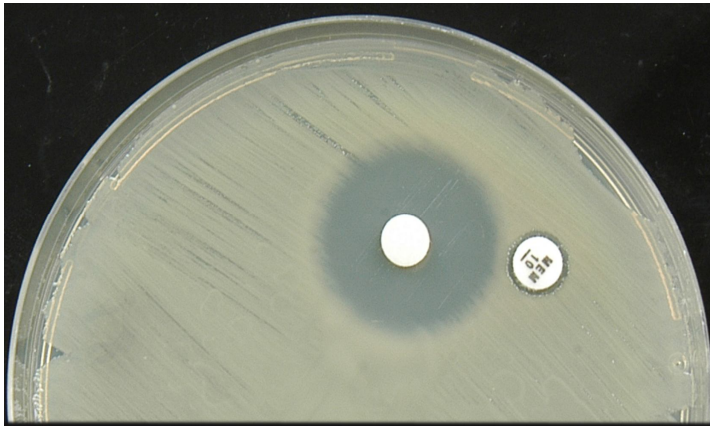
### 3.1.Metallo-Beta-Laktamaz Tayininde Kullanılan Fenotipik Testler

#### 3.1.1. Çift Disk Sinerji Testi

Çalışmaya alınan kökenlerde fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretiminin gösterilmesi amacıyla uygulanan ilk fenotipik test çift disk sinerji testidir. Çift disk sinerji testinin uygulandığı 10 *P. aeruginosa* kökeninin 10'unda (% 100) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 40 *A. baumannii* kökeninin 27'sinde (% 67.5) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 13'ünde (% 32.5) ise üretilmediği saptanmıştır. Şekil 2'de ÇDST pozitifliği ve şekil 3'de ÇDST negatifliği gösterilmiştir.



Şekil 2. Çift disk sinerji testinde pozitiflik



Şekil 3. Çift disk sinerji testinde negatiflik

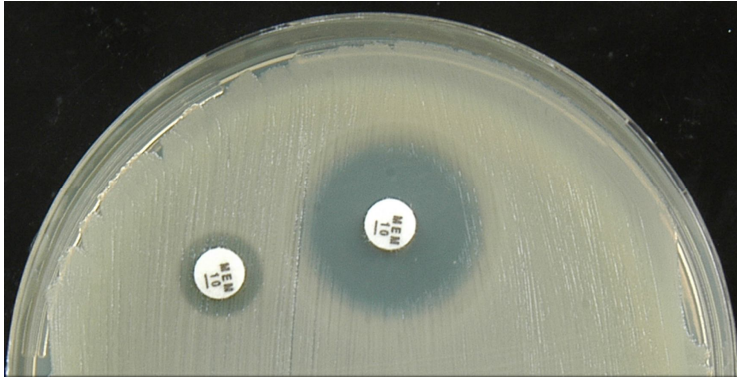
*Pseudomonas aeruginosa* ve *A. baumannii* için ÇDST ile diğer fenotipik testler arasındaki uyum oranları tablo 12'de gösterilmiştir.

**Tablo 12.** Çift disk sinerji testi ile diğer fenotipik yöntemlerin uyum oranları

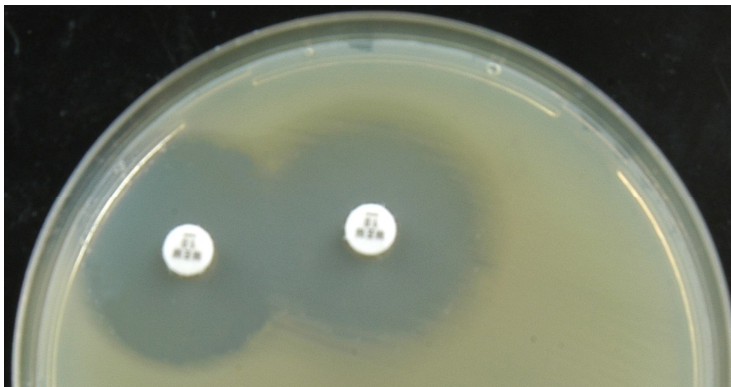
Fenotipik yöntem	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Kombine Disk Sinerji	% 67.5	% 80
Modifiye Hodge	% 72.5	% 60
E Test	% 70	% 60

### 3.1.2. Kombine disk sinerji testi (KDST)

Metallo-beta-laktamaz üretiminin gösterilmesi amacıyla uygulanan ikinci fenotipik test kombine disk sinerji testidir. Kombine disk sinerji testinin uygulandığı 10 *P. aeruginosa* kökeninin 8'inde (% 80) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 2'sinde (% 20) ise üretilmediği, 40 *A. baumannii* kökeninin 38'inde (% 95) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 2' sinde (% 5) ise üretilmediği saptanmıştır. Şekil 4'de KDST pozitifliği ve şekil 5'de KDST negatifliği gösterilmiştir.



**Şekil 4.** Kombine disk sinerji testinde pozitiflik



**Şekil 5.** Kombine disk sinerji testinde negatiflik

*Pseudomonas aeruginosa* ve *A. baumannii* için KDST ile diğer fenotipik testler arasındaki uyum oranları Tablo 12’de gösterilmiştir.

**Tablo 13.** Kombine disk sinerji testi ile diğer fenotipik yöntemlerin uyum oranı

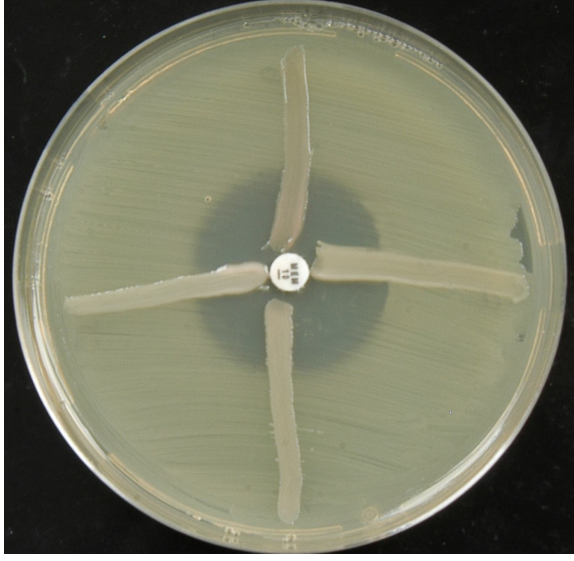
Fenotipik yöntem	<i>A. baumannii</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Modifiye Hodge Testi	% 72.5	% 60
E Test	% 95	% 60

### 3.1.3. Modifiye Hodge testi

Fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretiminin gösterilmesi amacıyla uygulanan üçüncü fenotipik test, modifiye hodge testidir. Modifiye Hodge testinin uygulandığı 10 *P. aeruginosa* kökeninin 6’sında (% 60) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 4’ünde (% 40) ise üretilmediği, 40 *A. baumannii* kökeninin 29’unda (% 72.5) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 11’inde (% 27.5) ise üretilmediği saptanmıştır. Şekil 6’de MHT pozitifliği ve şekil 7’de MHT negatifliği gösterilmiştir.



**Şekil 6.** Modifiye Hodge testinde pozitiflik

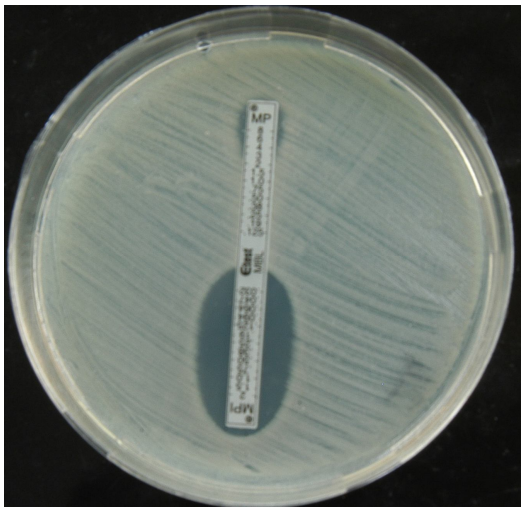


**Şekil 7.** Modifiye Hodge testinde negatiflik

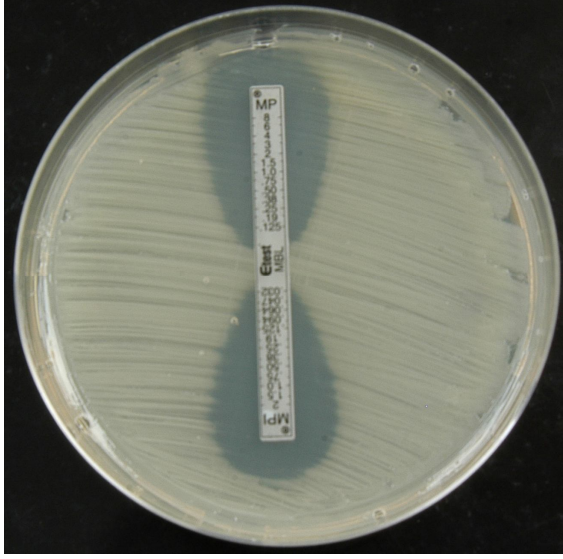
*Pseudomonas aeruginosa* suşlarında MHT ile E Test arasında % 80 uyum bulunurken, *A. baumannii* suşlarında MHT ile E Test arasında % 70 uyum bulunmuştur.

#### **3.1.4. MBL E test**

Kökenlere uygulanan dördüncü fenotipik test MBL E testtir. MBL E testinin uygulandığı 10 *P. aeruginosa* kökeninin 6'sında (% 60) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 4'ünde (% 40) ise üretilmediği, 40 *A. baumannii* kökeninin 39'unda (% 97.5) fenotipik olarak metallo-beta-laktamaz üretildiği, 1'inde (% 2.5) ise üretilmediği saptanmıştır. Şekil 8'de E Test pozitifliği ve şekil 9'de E Test negatifliği gösterilmiştir.



**Şekil 8.** E Test pozitiflik



**Şekil 9.** E Test negatif

Sonuçlar khi kare testine göre istatistiksel olarak yorumlandığında; *P. aeruginosa* için en etkili yöntemin ÇDST olduğu belirlenirken diğer testler arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).

*A. baumannii* için en etkili yöntem; MBL E test olup, E test ile KDST arasında anlamlı fark yoktur ( $p>0.05$ ). E test ile MHT ve ÇDST arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.001$ ). KDST ile MHT arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.05$ ). KDST ile ÇDST arasında anlamlı fark saptanmıştır ( $p<0.005$ ). MHT ile ÇDST arasında anlamlı fark saptanmamıştır ( $p>0.05$ ).



#### 4. TARTIŞMA

Antibakteriyel direncin son yıllarda hızla artması nedeniyle bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde güçlüklerle karşılaşmaktadır. En geniş spektrumlu beta laktam antibiyotik grubu olan karbapenemlere bile direnç gelişmektedir. Antibakteriyel spektrumlarının genişliği, amfilik özellikleri nedeniyle bakteriyel membranlardan hızla geçebilmeleri, AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olmaları gibi özellikleri nedeniyle karbapenemler; özellikle çoklu dirençli GN bakteri infeksiyonlarında ilk sırada kullanılırlar. Ancak, karbapenemlerin özellikle ampirik tedavide yaygın olarak kullanılması, bu antibiyotiklere karşı direnç oranlarının artmasıyla sonlanmıştır.

Son yıllarda immun sistemi baskılanmış ve ilaç tedavisi alan hasta gruplarında artan oranlarda görülen NFGN bakteriler önemli fırsatçı patojenler olarak ortaya çıkmaktadır. Karbapenem grubu antibiyotikler son seçenek durumunda olduğu için, özellikle yaşamı tehdit eden çoklu ilaç direnci gösteren GN bakterilerin yol açtığı ciddi infeksiyonlarda karbapenem direncinin ayrı bir önemi vardır. Hastane salgınları açısından önemli bakteri türlerinde buldukları için tanımlanmaları infeksiyon kontrolü açısından önemlidir. Hastane ortamında bakterilerin barınma ve direnç kazanma olasılıkları artmaktadır. Bakterilerdeki direnç oranları ülkeden ülkeye, bir ülkede ise bölgeden bölgeye ve hatta bölgede bulunan hastaneler arasında farklılıklar gösterir. Fakat asıl önemli olan bu oranların her merkez için zamanla artması ve bu artışın ciddi kaygılara neden olmasıdır. Japonya’da karbapenem direnci 1998’de % 19.3’den 2002’de % 38’e çıkmıştır (4). İnfeksiyonların tedavisinde ortaya çıkan bu problemler infeksiyonun erken kontrolü ve tedavisi açısından önemlidir. Bununla birlikte kaygıya neden olan diğer bir konuda yeni antimikrobiyal bileşiklere karşı bakteriler tarafından geliştirilen yeni direnç mekanizmalarıdır.

İmipenem ve meropenem duyarlılığının birbirine paralel olduğu kabul edilmektedir. CLSI tarafından da her iki karbapenemin antibiyogram değerlendirilmesinde birbirini temsil edebileceği önerilmektedir. Bal ve ark. (137), yaptıkları çalışmada GN bakterilerde meropenem ve imipenem duyarlılıklarını eşit oranlarda bulmuşlardır. Ancak, farklı porin veya pompa efluks sistemleri nedeniyle imipenem ve meropenem birbirinden bağımsız duyarlılıklara sahip olabilirler.

Son birkaç yılda dünya genelinde artan yayılmaları ile plazmidik MBL'ler gündemde yer tutmaktadır (3). Özellikle, NFGN basillerde IMP veya VIM tipi MBL'lerin yayılması iki nedenle epidemiyolojik risk oluşturur. Birincisi, IMP veya VIM tipi enzimleri kodlayan genler sıklıkla hareketli elemanlar üzerinde taşındıklarından dolayı farklı suşlar arasında horizontal olarak yayılabilirler. İkincisi, MBL'ler sadece karbapenemlere değil, tüm beta laktamlara direnç oluşturabilir ve beraberinde taşınabilen diğer direnç genleriyle aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı da çoklu direnç gösterebilmektedirler (138).

Karbapenem grubu antibiyotiklerin tedavi için tercih edildiği infeksiyonlarda, etkeni izole etmek kadar etkenin karbapenemaz ve MBL üretimini basit ve güvenilir bir laboratuvar metoduyla tespit etmek de önem kazanmaktadır. Ancak, ESBL'lerde olduğu gibi CLSI kriterlerine göre izolatlarda MBL üretimini tespit etmede geçerli bir metod henüz oluşturulmamıştır. Bununla birlikte, imipenem-meropenem EDTA kombine disk testi, MBL E test, çift disk sinerji testi, modifiye Hodge testi gibi çeşitli yöntemleri kullanan çalışmalar yapılmakta ve sonuçlar PCR sonuçları ile karşılaştırılmaktadır. Bazı çalışmalar olumlu sonuçlar verirken bazılarında yalancı pozitifliğin yüksek olduğu görülmektedir. Tabii ki, farklı ülkelerde farklı MBL prevalanslarının bu sonuçlar üzerindeki etkisi büyüktür. Bakterilerdeki MBL üretimi sonucu direncin yayılımı tüm dünya ile birlikte ülkemizde, hatta hastanemizde de önemli klinik sorunlar arasındadır. Ayrıca bu enzimlerin kromozomal kökenli MBL'mi, integronlar içerisinde yer alan aktarılabılır genlerden mi olduğu ile ilgili daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İntegronlar içerisinde bulunan gen kasetleri içerisinde MBL enzim sentezinden sorumlu olan genler yer almaktadır. İntegronlar, tek başlarına hareket edebilme yetenekleri olmayan ve aynı zamanda içlerinde bir ya da daha fazla gen kaseti taşıyabilen genetik elemanlardır. Bir bakteride ise birden fazla integron bulunabilir. Bu gen kasetlerinin düzeyi ve ekspresyonu 5' bölgesinde bulunan promotör bölgesinin aktif olmasına ve bakteride bulunan integron sayısına bağlıdır (139).

İntegronların hareket etme yetenekleri yoktur. Buna rağmen plazmidler ve transpozonlar içerisinde bulunma özelliklerine bağlı olarak bir bakteriden diğer bakteriye, hatta integronlar içerisinde yer alan gen kasetleri bir integrondan diğerine geçebilmektedir. Bu durum direnç yayılmasına neden olmaktadır. MBL üreten

bakterilerdeki direncin yayılımı aynı genotip içerisinde klonal bir şekilde olabildiği gibi bakteriden bakteriye gen transferi ile horizontal şekilde de olabilir. Yunanistan, İtalya, Kore, Çin, Tayvan ve Japonya’da yapılan çalışmalarda MBL üreten *P. aeruginosa* isolatlarının aynı genotipte olduğunu gösteren sonuçlar elde edilmiş, bu sonuçlar da direncin klonal yayıldığı düşüncesini desteklemiştir (140, 141).

Kore’de yapılan bir çalışmada MBL üreten *P. aeruginosa* izolatında bulunan VIM-2 tip enzim üreten integron yapısının başka bir bakteride yani VIM-2 üreten *Acinetobacter* suşunda bulunan integron yapısı ile aynı olduğu belirlenmiş ve bu çalışmanın sonuçları direncin horizontal yayıldığı görüşlerine destek olmuştur (140, 141).

Bakteriler MBL enzim üretimi sonucunda, aztreonam dışındaki bütün beta laktam antibiyotiklere yani karbapenemlere, sefalosporinlere ve sefamisinlere direnç kazanırlar. Bu enzimi üreten bakteri infeksiyonlarının tedavisinde bu antibiyotikler kullanılamaz. Önemli bir diğer sorun da aminoglikozid grubu antibiyotik direncine neden olan *aacA4* geni ile MBL enzimini kodlayan gen kasetlerinin yan yana bulunması, aminoglikozid direncine de neden olabileceğinden bu grup antibiyotiklerin kullanımı da sınırlanmaktadır. Böylece beta laktam antibiyotiklerinin dışında kanamisin, neomisin, amikasin ve streptomisin gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklerin hepsine de direnç gelişimi gözlenmektedir (110).

Bu çalışmaya alınan meropenem dirençli izolatlardan *A. baumannii*’nin yaklaşık %97.5’inde ve *P. aeruginosa*’nın ise % 70’inde amikasin direnci gözlenmektedir (Tablo 8).

Dünyadaki imipenem direnç oranlarını incelediğimizde *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türü bakterilerde giderek artan miktarlarda antibiyotik direnci görülmektedir. *Pseudomonas* için % 6 ile % 70 arasında değişen oranlarda imipenem direnci kaydedilirken *Acinetobacter*’lerde bu oran %13 ile %58 arasında değişmektedir (7,142).

*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türü bakterilere karşı ülkemizdeki imipenem direnci coğrafik bölgelere göre farklılık göstermekte ve *Pseudomonas*’larda yaklaşık % 4 ile % 85, *Acinetobacter*’lerde ise % 8 ile % 70 arasında değişmektedir (17,143-149).

Metallo-beta-laktamaz üreten bakterilerin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında erken tanısı hem dirençli izolatların yayılmasını önlemek açısından, hem de klinisyenleri tedavi konusunda erken bilgilendirmek açısından son derece önemlidir. Dirençli suşların oranlarının zamanla artış göstermesi laboratuvarlarda rutinde kolay uygulanabilen ve özgüllüğü yüksek, duyarlı yöntemlerin bulunmasını zorunlu kılmıştır. Bu amaç için geliştirilen fenotipik yöntemlerden MBL E test, çift disk sinerji testi, kombine disk testi ve modifiye Hodge testinin duyarlılığı ve özgüllüğü ile ilgili çalışmaların yapılmasına devam edilmektedir. Günümüzde halen duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir test yönteminin olmaması araştırmacıları daha fazla çalışma yapmaya yöneltmiştir. Çalışmaların çoğunda bir veya iki fenotipik yöntem uygulanmış, PCR analizi ile sonuçlar doğrulanmıştır. Bu çalışmada ise dört farklı fenotipik yöntemle MBL enzimi varlığı saptanmaya çalışılmıştır. Bu yöntemler MBL E test, çift disk sinerji testi, kombine disk testi ve modifiye Hodge testidir (110, 134).

Bu çalışmada meropenem dirençli olduğu saptanan 40 tane *A. baumannii* ve 10 tane *P. aeruginosa* izolatı seçilmiştir. Bu izolatlar aynı zamanda beta laktam grubunda yer alan antibiyotiklerden (meropenem, imipenem, ceftazidim, sefoperazon/sulbaktam) en az bir tanesine daha dirençli bulunmuştur. MBL enzim saptanmasında kullanılan testlerin temelinde enzimin metal şelatör tarafından inhibisyonu mantığı vardır. Kombine disk yöntemi de bu prensibe dayanan testlerden bir tanesidir.

Yong ve ark. (150), çoğunluğu VIM-2 üreten MBL pozitif *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* izolatlarında imipenem-EDTA disk metodunu test etmişler, 750 ve 1000 mg EDTA içeren farklı iki kombine disk hazırlamışlardır. 750 mg EDTA içeren diskin kullanıldığı yöntem tüm MBL üreten *Pseudomonas*'ları ayırt edebilmiş ve *Acinetobacter spp.* için duyarlılığı ve özgüllüğü, sırasıyla % 95.7 ve % 91 olarak bulunmuştur. *Pseudomonas spp.*'de tüm MBL pozitif izolatlar, EDTA eklendiğinde  $\geq 7$  mm inhibisyon zonunda artış göstererek MBL negatif izolatlardan iyi bir şekilde ayrılmıştır. Tek başına kombine diskin inhibisyon zonlarının büyüklüğünün de yararlı olduğu gösterilmiş, MBL pozitif izolatlarda imipenem-EDTA disklerinin inhibisyon zonları  $\geq 17$  mm iken MBL negatif izolatlarda  $\leq 14$  mm tespit edilmiştir. Bu çalışmada imipenem-EDTA disk metodunun basit ve oldukça duyarlı olduğu,

özgüllüğünün *Pseudomonas spp.* için mükemmel, *Acinetobacter spp.* için iyi olduğu görülmektedir.

Yan ve ark. (129) 2004 yılında yaptıkları çalışmada kombine disk yöntemi ile imipeneme dirençli *Pseudomonas* 'larda %86,7 oranında MBL pozitifliği saptamışlar ve testin duyarlılığının % 70 olduğunu belirtmişlerdir.

Altoparlak ve ark. (151) Erzurum'da karbapenemlere dirençli 40 tane *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşunun imipenem-EDTA kombine disk yöntemi ile 22 (% 55)'sinde pozitiflik bulmuşlardır.

Oh ve ark. (152) 2003 yılında yayınlanan raporlarında, disk difüzyon yöntemiyle imipenem ve/veya seftazidim dirençli *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* izolatlarına KDST'i uygulamış ve sonuçları PCR analizi ile doğrulamıştır. Bu araştırmacılar, KDST'nin VIM benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısındaki duyarlılığının % 93.9 olduğunu belirtirken, IMP benzeri enzim üreten izolatların fenotipik tanısında başarısız olduğunu bildirmişlerdir.

Pitout ve ark. (153), MBL üreten *P. aeruginosa* izolatlarını tespit etmek için bir EDTA disk tarama testi geliştirmişlerdir. İmipenem ve meropenem disklerinin tek başına ve 930 µg EDTA ile kombinasyonunda, inhibisyon zon çapları belirlenmiş ve bu testin MBL E test ile kıyaslanabilir olduğu görülmüştür. PCR ile *blaVIM* ve *blaIMP* genlerine sahip izolatlarda meropenem-EDTA disk tarama testi % 100 duyarlılık, % 97 özgüllük gösterirken imipenem-EDTA disk testi % 96 duyarlılık, % 91 özgüllük göstermiştir. 930 µg EDTA varlığında  $\geq 7$  mm zon çapında artış MBL varlığı için pozitif test olarak kabul edilmiştir. Bu çalışma, meropenemi substrat olarak kullanan yayınlanmış ilk çalışma olmuştur. Meropenemin EDTA ile kombine edilmesinde imipenemden daha iyi bir substrat olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada; meropenem-EDTA kombine disk testi ile 40 tane *A. baumannii* izolatının 38'inde (% 95), 10 tane *P. aeruginosa* 'nın 8'inde (% 80) MBL pozitifliği saptanmıştır. Elde ettiğimiz sonuçlar, meropenemin imipenemden daha iyi bir substrat olduğu tezini desteklemektedir.

Çift disk sinerji testi ile ilgili bir çok çalışma yapılmış ve MBL tesbitinde kolay uygulanabilir, duyarlı bir yöntem olduğu konusunda veriler elde edilmiştir. Çift disk sinerji testinde yanlış pozitif sonuç elde edilmesinin en önemli nedeni,

metal şelatör olarak kullanılan EDTA ve 2-MPA'in tek başına da özgül olmayan geniş inhibisyon zonu oluşturabilmesidir (154).

Lee ve ark. (154) 2003 yılında yaptıkları bir çalışmada imipeneme dirençli ve orta derecede dirençli olan, ceftazidime dirençli olan *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türlerinde imipenem-EDTA ve ceftazidim-2-MPA kombinasyonlarını denemişler ve EDTA'nın metal şelatörü olarak daha etkin olduğu konusunda veriler elde etmişlerdir. İmipenem-EDTA çift disk sinerji testinin MBL saptanmasındaki duyarlılığının *Pseudomonas* türlerinde yaklaşık % 89, *Acinetobacter* türlerinde ise % 100 olduğunu bulmuşlardır.

Lee ve ark. (155); başka bir çalışmada ise MBL enzimi saptanmış olan 530 *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* türünde IPM hidrolizi açısından spektrofotometrik olarak bakıldığında, bu suşların hepsinin IPM hidrolize ettiğini saptamış ve testin duyarlılığının % 100 olduğunu bildirmişlerdir.

Jesudasan ve ark. (156) imipenem-EDTA çift disk sinerji testinin modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğu yönünde bulgulara rastlamışlardır (156).

Arakawa ve ark. (157), 1999 yılında Japonya'da yaptıkları bir çalışmada IMP-1 tipi MBL üreten GN bakterilere biri seftazidim (CAZ) diğeri ise bir MBL inhibitörü içeren iki disk kullanarak çift disk sinerji testi uygulamışlardır. 2-merkaptopropionik asit (MPA) ve EDTA gibi tiol bileşikleri içeren diskler kullanılmış ve CAZ diski ile aralarında merkezden merkeze 1-2,5 cm mesafe bırakılarak antibiyogram plağına yerleştirilmiştir. IMP-1 üreten suşlarda CAZ diski ile tiol bileşiği içeren diskin arasındaki inhibisyon zonu daha genişleşmişken serin beta laktamaz üreten suşlarda ise inhibisyon zonlarının şeklinde belirgin bir değişme görülmemiştir. Bu testin özgüllük ve duyarlılığı PCR analizleri ile kıyaslanabilir nitelikte bulunmuştur.

Bu çalışmada ise çift disk sinerji testi ile 40 tane *A. baumannii* izolatının 27'sinde (% 67.5), 10 tane *P. aeruginosa* izolatının 10'unda (% 100) da MBL pozitifliği saptanmıştır. ÇDST ile *P. aeruginosa*'da diğeri fenotipik yöntemlerden daha yüksek oranlarda MBL pozitifliği tesbit edilmiştir.

Modifiye Hodge testi ise MBL tesbitinde kullanılan diğeri bir fenotipik yöntemdir. Bu test diğeri fenotipik yöntemlerden farklı olarak MBL inhibisyonu temeline dayanmaz. İmipeneme veya meropeneme duyarlı olan bir bakterinin, MBL

enzimi üreten başka bir bakterinin varlığında imipenemin veya meropenemin etkisiz hale gelmesi sonucu diskin etrafında üremenin görülmesi ile testin pozitifliği saptanır (158).

Lee ve ark.(159) yaptığı bir çalışmada imipeneme dirençli olduğu saptanan *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter spp.* izolatlarında modifiye Hodge testi ile MBL tesbit edildikten sonra bu izolatlara doğrulama için PCR analizi yapılmış ve testin duyarlılığı % 100, özgüllüğü ise % 88 oranında bulunmuştur.

Jesudasan ve ark. (160) ise imipeneme dirençli Gram negatif non fermentatif bakterilerde MBL pozitifliğini % 56 oranında bulduklarını bildirmiş, modifiye Hodge testi ile karşılaştırdıklarında ise imipenem-EDTA çift disk sinerji testinin modifiye Hodge testine göre daha duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Ulusoy ve ark. (134) yaptığı bir çalışmada ise çalışmaya alınan 79 *Acinetobacter* izolatının MHT ile 55'i (%69.6) MBL pozitif, 24'ü (%30.4) ise negatif olarak bulunmuştur.

Noyal ve ark. (159) 2009 yılında yaptığı bir çalışmada meropeneme dirençli 32 *P. aeruginosa* izolatının 9 (% 28.1)'unda MHT ile MBL üretimi tesbit edilirken 46 *A. baumannii* izolatının sadece 2 (% 2.2)'sinde MBL üretimi tesbit edilmiştir.

Bu çalışmada modifiye Hodge testi ile meropeneme dirençli 40 *Acinetobacter baumannii* izolatının 29 (% 72.5)'unda, 10 *P. aeruginosa* izolatının 6 (%60)'sında MBL pozitifliği saptanmıştır. Noyal ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre daha yüksek oranda MBL pozitifliği elde edilmiştir.

MBL tayininde sık kullanılan fenotipik testlerden biri de MBL E test yöntemidir. E test stripleri ticari olarak kolay elde edilebilir. Diğer fenotipik testlerin çoğunda olduğu gibi EDTA varlığında MBL enziminin inhibisyonu temeline dayanan bir testtir. Test stribinin bir tarafına imipenem veya meropenem diğer tarafında ise EDTA katkılı imipenem veya meropenem bulunmaktadır. Değerlendirirken MİK değerleri okunarak değerlendirildiği için değerlendirmenin daha objektif olduğu düşünülmektedir (134).

Yan ve ark. (129) imipeneme dirençli izolatlarda E test uygulamışlar ve E test sonuçlarına göre MBL negatif olan suşları PCR yöntemi ile de negatif veya tanımlanamaz değerde bulduklarını belirterek MBL saptanması için E testin kullanışlı olduğunu savunmuşlardır.

Walsh ve ark. (160) 2005 yılında yaptıkları başka bir çalışmada da E test yöntemi ile MBL saptanan 31 *Pseudomonas* suşunun ancak 25 tanesinde PCR yöntemi ile MBL enzimi bulunduğu saptanmıştır.

Yunanistan'da yapılan bir çalışmada hastanedeki salgın sırasında 53 *P. aeruginosa* izolatında E test yöntemi ile imipeneme dirençli suşlardan 44 tanesinde MBL pozitif bulunmuş. Daha sonra bu suşlara PCR yöntemi uygulanmış ve E test yönteminin MBL ürettiği saptanan 3 suşu tesbit edemediği görülmüştür. Bu da E test yönteminin yanlış pozitif sonuç verebildiği gibi yanlış negatif sonuç da verebildiğini göstermiştir.

Fırat Üniversitesi Hastanesinde yapılan bir çalışmada Toraman ve ark. (161) 2004 yılında MBL varlığını E test yöntemi ile tesbit etmişler ve *P. aeruginosa*'da %29, *A. Baumannii*' de %21 pozitiflik saptamışlardır. Diğer bir çalışmada ise Şişli Etfal hastanesinde Bayraktar ve ark. (162) karbapeneme dirençli 27 *P. aeruginosa* izolatından 17 tanesinde MBL pozitifliği saptamışlar, daha sonra PCR yöntemi ile sonuçların doğrulandığını bildirmişlerdir.

İtalya'da yapılan başka bir çalışmada ise, 21 tane imipenem dirençli *A. baumannii* izolatında referans yöntemlerle MBL pozitifliği saptanamazken E test ile dört tane yanlış pozitiflik saptanmıştır (163).

Bu çalışmada ise MBL E test yöntemi ile 40 *A. baumannii* izolatının 39'unda (% 97.5), 10 *P. aeruginosa* izolatının 6'sında (% 60) MBL pozitif bulunmuştur. Bu sonuçlar meropeneme dirençli suşlarda MBL E test yönteminin güvenilir olduğunu düşündürmüştür. Elde edilen verilere göre özellikle *Acinetobacter* suşlarındaki yüksek pozitiflik dikkat çekici bulunmuştur. Literatürde MBL tayininde en yüksek özgüllük ve duyarlılık E test yöntemi ile bildirilmiştir (164, 165). Bu çalışmada da, MBL'nin fenotipik tayininde meropeneme dirençli izolatlara E test uygulanmıştır, ancak E testin özgüllük ve duyarlılık yorumları direnç genlerinin gösterilememiş olması nedeniyle yapılamamıştır.

Elde ettiğimiz sonuçların doğrulanması için genotipik yöntemlerle MBL varlığının ortaya konması gerekmektedir ve böyle bir doğrulama çalışması planlanmaktadır. Bu basit ve ucuz fenotipik yöntemlerin tarama amaçlı kullanılması ile MBL üreten GN basillerin yayılımının önlenmesi ve daha hızlı enfeksiyon kontrolü sağlanabilecektir.



Literatür taramalarına göre; MBL üretimi için yapılan fenotipik testlerin çoğunda substrat olarak imipenem kullanılmıştır. Bu çalışmada ise substrat olarak meropenem kullanılmıştır. Elde edilen verilere göre MBL oranları imipenemle yapılan çalışmalara benzer bulunmuştur.

Hastanemiz izolatlarında farklı yöntemlerle tespit etmiş olduğumuz bu oranlar diğer çalışmalardaki oranlara benzerlik göstermektedir. Özellikle *A. baumannii* suşlarında daha yüksek oranlarda MBL tespit edilmiştir. Fakat *P. aeruginosa* izolatlarında da azımsanamayacak düzeyde MBL pozitifliği tesbit edilmiştir. Tesbit edilen bu oranlar hastanemizde önemli nazokomiyal infeksiyon ajanları arasında kabul edilen bu bakteri gruplarında MBL aktivitesinin takibi açısından daha dikkatli olunması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Sonuç olarak; Kore’de dahil çoğu asya ülkesinde *Acinetobacter* enfeksiyon prevalansı artmıştır ve organizmaların çoğu dirençlidir (166). *Acinetobacter* enfeksiyonlarında en önemli sorun çoklu dirençli suşlardır. Bu nedenle zor durumlarda kullanılmak üzere birkaç antibiyotik saklanmalıdır (167).

Artan direnç sorunuyla başa çıkmak için yeni antimikrobiyal ilaçlar geliştirilmiş fakat onlara da direnç hızla artmıştır (168). Biliyoruz ki antimikrobiyal ajanlar kullanıldığı sürece dirençte doğal olarak gelişecektir. Bu yüzden antibiyotiklerin dozlarını artırmadan etki süresini uzatmanın yolları araştırılmalıdır (169). Direnç sorununu çözmeye sadece hasta hekim eğitimi yeterli olmayabilir. Bazen yoğun bakım ünitelerinde bile karbapenem kullanımının doğru olmadığı bildirilmiştir (170).

Direnç yayılımını sınırlamak ve tedaviye yön vermek amacıyla karbapenem direnç tiplerinin rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında tespit edilmesi ve epidemiyolojik analizlerinin yapılması gerekmektedir.

Karbapenem dirençli NFGN suşlarımızın büyük bölümünde fenotipik yöntemlerle MBL pozitifliği gösterilmiştir. Böylece karbapenem direncinden büyük oranda MBL üretiminin sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Testlerin genotipik olarak doğrulanması ile daha iyi yorumlanması mümkün olacak ve bu fenotipik yöntemlerin tarama amaçlı kullanılmasıyla MBL üreten GN basillerin yayılımı önlenerek daha hızlı infeksiyon kontrolü sağlanabilecektir.

## 5. KAYNAKLAR

1. Kohler T, Michea-Hamzhepour M, Epp SF, Pechere JC. Carbapenem activities against *Pseudomonas aeruginosa*: respective contributions of OprD and efflux systems. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 424-7.
2. Pai H, Kim JW, Kim J. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 480-4.
3. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 321-33.
4. Fritsche 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: S276-8.
5. Petersen K, Cannegieter SC, van der Reijden TJ, van Strijen B, You DM, Babel BS, et al. Diversity and clinical impact of *Acinetobacter baumannii* colonization and infection at a military medical center. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 159-66.
6. 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: 309-375.
7. Enoch DA, Birkett CI, Ludlam HA. Non-fermentative Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2007; 3: 33-41.
8. Bahar H, Esen N. *Acinetobacter* ve Non-fermantatif basiller. İçinde Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Editörler. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji*, Nobel Tıp Kitabevi, 2006: 1618-1627.
9. Schreckenberger PC, Graevenitz A. *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Moraxella*, *Methylobacterium* and other nonfermentative Gram-negative rods. Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH (Eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 7 th ed. Washington DC: ASM press, 1999: 539-560.

10. Bergogne-Berezin E, Towner KJ. Acinetobacter spp. as nosocomial pathogens: Microbiological, clinical and epidemiological features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148–165.
11. Akalın H. Çoğul dirençli Gram negatif bakteriler. Doğanay M, Ünal S. Hastane İnfeksiyonları. Ankara: Ankara Bilim TıpYayınevi, 2003; 269–89
12. Berezin BE, Towner KJ. Acinetobacter spp. As nosocomial pathogens: Microbiological, Clinical and Epidemiological Features. Clin Microbiol Rev 1996; 9: 148–165.
13. Towner KJ. Clinical importance and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. J. Med. Microbiol 1997; 46: 721–746.
14. Levin AS. Multiresistant Acinetobacter infections: a role for sulbactam combinations in overcoming an emerging worldwide problem. Clin Microbiol Infect 2002; 8: 144-153.
15. Erdem B, Ustaçelebi Ş. Pseudomonaslar, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: 1999; 552–557.
16. Bilgehan H. Non-fermentatif Gram olumsuz basiller. Klinik Mikrobiyoloji Barış Kitabevi, İzmir, 1995: 161–178.
17. Bergagne E. Pseudomonas and miscellaneous Gram negative bacilli. In: Colman J, Powerdyly GW eds. Infectious Diseases. Second ed, Toronto, 2004: 1733-1748.
18. Erdem B. Pseudomonaslar, Ustaçelebi Ş. (ed): Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Gündeş Kitabevi, 1999: 551-557.
19. Akalın H. Pseudomonas İnfeksiyonları. 6. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, Program ve Özet kitabı, 2004, 124-130
20. Baron E, Finegold S, Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 7th ed. Mosby Co, St Louis, 1986: 422-424
21. Özgüven V, Dizer U. Sefalosporinler. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (eds): İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Kitabı, İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2002: 202.

22. Essack SY. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharmaceutical Research* 2001; 18: 1391-1399.
23. Gür D. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan Gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997; 1: 38-45.
24. Opal SM, Medeiros AA. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005: 253-270.
25. Chambers HF. Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005: 281-93.
26. Andes DR, Craig WA. Cephalosporins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc, 2005: 294-311.
27. Harold C, Neu M D. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *Am J Med* 1985; 2: 2-13.
28. Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 489-495.
29. Bonfiglio G, Russo G, Nicoletti G. Recent developments in carbapenems. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 529-544.
30. Basoli A, Az M, Mazzocchi P, Speranza V, and study group. Imipenem/silastatin (1,5 g daily) versus Meropenem (3,0 g daily) in patients with intraabdominal infections: Results of prospective, randomized, multicentre trial. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 503-508.
31. Bimbaum J, Kahan FM, Kroop H. Carbapenems, a new class of beta-lactam antibiotics: Discovery and development of imipenem-cilastatin. *Am J Med* 1985; 78: 3-21.
32. Nikaido H. Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985; 27: 197-231.

33. Endtz HP, Dijk WC, Verbrugh HA and Mustin Study Group. Comparative in vitro activity of meropenem against selected pathogens from hospitalized patients in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39: 149-156.
34. Yang Y, Bhached N, Bush K. Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: Permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 75-84.
35. Jackson JJ, Kroop H. Beta-lactam antibiotics induced release of free endotoxin: In vitro comparison of penicillin-binding protein (PBP)2-specific imipenem and PBP3-specific ceftazidim. *J Infect Dis* 1992; 165: 1033-1041.
36. Gudmundsson S, Erlendsdttir H, Gattfrendsson M, Gudmundsson A. The postantibiotics effect induced by antimicrobial combinations. *Scand J Infect Dis* 1990; 74: 80-93.
37. Yoshimura F, Nikaido H. Diffusion of beta-lactam antibiotics. *Pharmacol Ther* 1985; 27: 197-231.
38. Dreetz M, Hamacher J, Eller J. Serum bactericidal activities and comparative pharmacokinetics of meropenem and imipenem-cilastatin. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 105-109.
39. Edwards JR. Meropenem: a microbiological overview. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36: 1-17.
40. White Friedrich L, Burgess D, Warkentin D, Bosso J. Comparative in vitro pharmacodynamics of imipenem and meropenem against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 904-908.
41. Gür D. Beta-laktamazlar. *Flora* 1997; 283: 3-16.
42. Yang, Livermore DM. Interactions of meropenem with class C chromosomal beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 187-96.
43. Kitzis MD, Acar JF, Gutmann L. Antibacterial activity of meropenem against Gram negative bacteria with a permeability defect and against staphylococci. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24: 125-132.

44. Sumita Y, Fukasawa M, Okuda T. Comparison of two carpapenems, SM-7338 and imipenem: affinities for penicillin-binding proteins and its release from these proteins in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents and Chemother* 1990; 34: 484-486.
45. Gür D. Gram-Negatif Bakterilerde Antibakteriyel Direnç Mekanizmaları. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D (editörler). Önemli ve sorunlu Gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ankara, 2004: 69-83.
46. Malouin F, Bryan LE. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986; 30: 1-5.
47. Spratt BG. Resistance to beta-lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. Bryan LE (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin: Springer-Verlag, 1989: 77-100.
48. Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78: 7-16.
49. Sanders CC. Beta-lactamases of Gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1089-1099.
50. Sanders CC, Sanders WE. Beta-lactam resistance in Gram-negative bacteria: Global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 1992; 15: 824-839.
51. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
52. Cornaglia G, Mazzariol A, Fontana R. The astonishing complexity of antibiotics resistance. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6: 93-94.
53. Pool K. Resistance to beta-lactam antibiotics. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 2200-2223.
54. Gür D. Beta-laktamazların sınıflandırılması. *Flora Dergisi* 1996,1: 80-86.
55. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211-1233.

56. Livermore DM. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbial Rev*, 1995; 8: 557-584.
57. Medeiros AA. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24,19-45.
58. Yuluğ N. Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *ANKEM Derg* 1997; 11: 205-207.
59. Livermore DM. Beta-lactamase mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41: 24-41.
60. Danel F, Hall LMC, Gür D, Akalın HE, Livermore DM. Transferable production of PER-1 beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35: 281-294.
61. Vahapoğlu H, Hall LM, Mülazımoğlu L. Resistance to extended spectrum cephalosporins, caused by PER-1 beta-lactamase in *Salmonella typhimurium* from Istanbul, Turkey. *J Med Microbiol* 1995; 43: 294-299.
62. Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10(PSE-)beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1637-1644.
63. Amyes SGB. Carbapenemases. *ANKEM Dergisi* 1997; 11: 221-225.
64. Rasmussen B A, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 223–232.
65. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1211–1233.
66. Massidda O, Rossolini GM, Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173: 4611–4617.
67. Oh EJ, Lee S, Park YJ, Park JJ, Park K, Kim SI, et al. Prevalence of metallo- $\beta$ -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean

university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo- $\beta$ -lactamase. *J Microbiol Methods* 2003; 54: 411–418.

68. Garau G, Bebrone C, Anne C, Galleni M, Frere JM, Dideberg OA. Metallo- $\beta$ -lactamase enzyme in action: Crystal structures of the monozinc carbapenemase CphA and its complex with biapenem. *J Mol Biol* 2005; 345: 785–795.
69. Docquier JD, Lamotte-Brasseur J, Galleni MG, Amicosante J, Frere, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 257–66.
70. Lim HM, Pene JJ, Shaw RW. Cloning, nucleotide sequence and expression of the *Bacillus cereus* 5/B/6  $\beta$ -lactamase II structural gene. *J. Bacteriol* 1988; 170: 2873–78.
71. Chen YH, Succi J, Tenover FC, Koehler TM.  $\beta$ -Lactamase genes of the penicillin-susceptible *Bacillus anthracis* Sterne strain. *J Bacteriol* 2003; 185: 823–830.
72. Walsh TR, Hall L, Assinder SJ, Nichols WW, Cartwright SJ, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis of the L1 metallo- $\beta$ -lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* 1994; 1218: 199–201.
73. Massidda O, Rossolini G M and Satta G. The *Aeromonas hydrophila* cphA gene: molecular heterogeneity among class B metallo- $\beta$ -lactamases. *J Bacteriol* 1991; 173: 4611–4617.
74. Rossolini GM, Franceschini N, Lauretti L, Caravelli B, Riccio M L, Galleni M, et al. Cloning of a *Chryseobacterium* (Flavobacterium) meningosepticum chromosomal gene (blaACME) encoding an extended-spectrum class A  $\beta$ -lactamase related to the *Bacteroides* cephalosporinases and the VEB–1 and PER  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother* 1999; 43: 2193–99.
75. Bellais S, Poirel L, Leotard S, Naas T, Nordmann P. Genetic diversity of carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamases from *Chryseobacterium* (Flavobacterium) indologenes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2000; 44: 3028–3034.
76. Boschi L, Mercuri PS, Riccio ML, Amicosante G, Galleni M, Frere JM, Rossolini GM. The *Legionella* (Fluoribacter) gormanii metallo- $\beta$ -lactamase: a new member of the highly divergent lineage of molecular-subclass B3  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1538–1543.



77. Simm AM, Higgins CS, Pullan ST, Avison MB, Niumsup P, Erdozain OP. A novel metallo- $\beta$ -lactamase, Mbl1b, produced by the environmental bacterium *Caulobacter crescentus*. *FEBS Lett* 2001; 509: 350–354.
78. Mammeri H, Bellais S and Nordmann P. Chromosome-encoded  $\beta$ -lactamases TUS–1 and MUS–1 from *Myroides odoratus* and *Myroides odoratimimus* (Formerly *Flavobacterium odoratum*), new members of the lineage of molecular subclass B1 metalloenzymes. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 3561–3567.
79. Rossolini GM, Condemi MA, Pantanella F, Docquier JD, Amicosante G, Thaller MC. Metallo- $\beta$ -lactamase producers in environmental microbiota: new molecular class B enzyme in *Janthinobacterium lividum*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 837–844.
80. Naas T, Bellais S, Nordmann P. Molecular and biochemical characterization of a carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase from *Flavobacterium johnsoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 267–273.
81. Saavedra MJ, Peixe L, Sousa JC, Henriques I, Alves A, Correia A. Sfh–1, a subclass B2 metallo- $\beta$ -lactamase from a *Serratia fonticola* environmental isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 2003; 47: 2330–2333.
82. Walsh TR, MacGowan AP, Bennett PM. Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine  $\beta$ -lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41: 1460–1464.
83. Rasmussen BA, E Kovacs. Identification and DNA sequence of a new *Bacteroides fragilis* insertion sequence-like element *Plasmid* 1991; 25: 141–144.
84. Thompson JS, Malmay MH. Sequencing of the gene for an imipenem-cefoxitinhydrolyzing enzyme (CfiA) from *Bacteroides fragilis* TAL2480 reveals strong similarity between CfiA and *Bacillus cereus*  $\beta$ -lactamase BCII. *J Bacteriol* 1990; 172: 2584–2593.
85. Lee K, Lee WG, Uh Y, Ha GY, Cho J, Chong Y. VIM- and IMP-type metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. in Korean hospitals. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 868–871.

86. Lombardi G, Luzzaro F, Docquier JD, Riccio ML, Perilli M, Coli A. Nosocomial infections caused by multidrug-resistant isolates of *Pseudomonas putida* producing VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4051–55.
87. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1584–1590.
88. Poirel L, Lambert T, Turkoglu S, Ronco E, Gaillard J, Nordmann P. Characterization of class 1 integrons from *Pseudomonas aeruginosa* that contain the blaVIM-2 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase gene and of two novel aminoglycoside resistance gene cassettes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 546–552.
89. Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M. A novel integron-like element carrying the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 1612–1615.
90. Bennett PM. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43: 1–4.
91. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116–119.
92. Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaIMP-13, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance proGramme. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 583–590.
93. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M and Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 1991; 35: 147–151.
94. Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito HF, et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother* 1994; 38: 71–78.

95. Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T and Inoue M. Plasmid-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob. Agents Chemother* 2001; 45: 1343–1348.
96. Cornaglia G, Riccio ML, Mazzariol A, Lauretti L, Fontana and Rossolini GM. Appearance of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase in Europe. *Lancet* 1999; 353: 899–900.
97. Daiyasu H, Osaka K, Ishino Y, Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the  $\beta$ -lactamase fold. *FEBS Lett* 2001; 503: 1–6.
98. Lauretti L, Riccio M L, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob. Agents Chemother* 1998; 43: 1584–1590.
99. Scoulica EV, Neonakis IK, Gikas AI, Tselentis YJ. Spread of blaVIM-1-producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the blaVIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase gene. *Diagn. Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 167–172.
100. Poirel L, Collet L, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing metallo  $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 84–85.
101. Lamotte-Brasseur J, Docquier JD, Galleni M, Amicosante G, Frere JM, Rossolini GM. On functional and structural heterogeneity of VIM-type metallo- $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 257–266.
102. Lagatolla C, Tonin EA, Monti-Bragadin C, Dolzani L, Gombac F, Bearzi C, Edalucci E, et al. Endemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with acquired metallo- $\beta$ -lactamase determinants in European hospital. *Emerg Infect Dis* 2004; 10: 535–538.
103. Cardoso O, Leitao R, Figueiredo A, Sousa JC, Duarte A, Peixe LV. Metallo- $\beta$ -lactamase VIM-2 in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from Portugal. *Microb Drug Resist* 2002; 8: 93–97.
104. Mendes RE, Castanheira M, Garcia P, Guzman M, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. First isolation of blaVIM-2 in Latin America: Report from the SENTRY

- Antimicrobial Surveillance ProGram. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1433–1434.
105. Prats G, Miro E, Mirelis B, Poirel L, Bellais S, Nordmann P. First isolation of a carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 932–933.
  106. Sardelic S, Pallecchi L, Punda-Polic V, Rossolini GM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-carrying VIM–2 metallo- $\beta$ -lactamase determinants, Croatia. *Emerg. Infect Dis* 2003; 9: 1022–1023.
  107. Walsh TR, Toleman MA, Hryniewicz W, Bennett PM, Jones RN. Evolution of an integron carrying blaVIM–2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance ProGram. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 116–119.
  108. Yatsuyanagi J, Saito S, Harata S, Suzuki N, Ito Y, Amano K, Enomoto K. Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM–2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 626–628.
  109. Yum JH, Yong D, Lee K, Kim HS, Chong Y. A new integron carrying VIM–2 metallo- $\beta$ -lactamase gene cassette in a *Serratia marcescens* isolate. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; 42: 217–219.
  110. Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana RG, Rossolini M, Cornaglia G. Detection of VIM–5 metallo- $\beta$ -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 282–283.
  111. Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo- $\beta$ -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM–3, a novel variant of the VIM–2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 2224–2228.
  112. Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouveleki LS and Maniatis AN. Novel variant (blaVIM–4) of the metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM–1 in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2002; 46: 4026–4028.
  113. Pagniez G, Radice M, Amoroso A, Famiglietti A, Gutkind G. Abstr. 44th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, abstr. Washington DC, 2004: 1–293

114. Simm AM, Toleman MA, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50: 673–679.
115. Poirel L, Magalhaes M, Lopes and Nordmann P. Molecular analysis of metallo- $\beta$ -lactamase gene blaSPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1406–1409.
116. Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo- $\beta$ -lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 582–587.
117. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4654–4661.
118. Bebrone C. Metallo- $\beta$ -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochemical Pharmacology* 2007; 9444: 1–16
119. Daiyasu HK, Osaka Y, Ishino HT. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the  $\beta$ -lactamase fold. *FEBS Lett* 2001; 503: 1–6.
120. Osaka K, Ishino Y, Daiyasu H, Toh H. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the  $\beta$ -lactamase fold. *FEBS Lett* 2002; 53: 1–6.
121. Goto M, Takahashi T, Yamashita F, Koreeda A, Mori H, Ohta M, Arakawa Y. Inhibition of the metallo- $\beta$ -lactamase produced from *Serratia marcescens* by thiol compounds. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 1136–1140.
122. Toney JH, Cleary KA, Hammond GG, Yuan X, May WJ, Hutchins SM, et al. Structure-activity relationships of biphenyl tetrazoles as metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 1999; 9: 2741–2746.
123. Payne DJ, Hueso-Rodriguez JA, Boyd H, Concha NO, Janson CA, Gilpin M. Identification of a series of tricyclic natural products as potent broad-spectrum inhibitors of metallo- $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1880–1886.

124. Tsang WY, Dhanda A, Schofield CJ, Frere JM, Galleni M, Page MI. The inhibition of metallo- $\beta$ -lactamase by thioxo-cephalosporin derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 1737–1739.
125. Buynak JD, Chen H, Vogeti L, Gadachanda VR, Buchanan CA, Palzkill T, et al. Penicillin-derived inhibitors that simultaneously target both metallo- and serine- $\beta$ -lactamases. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14: 1299–304.
126. Yan JJ, Wub JJ, Tsaia TS, Chuang LC. Comparison of the double-disk, combined disk, and Etest methods for detecting metallo B-lactamases in Gram-negative bacilli. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49: 5–11.
127. Payne DJ, Cramp R, Bateson JH, Neale J, Knowles D. Rapid identification of metallo- and serine  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 991–996.
128. Migliavacca R, Docquier JD, Mugnaioli C. Simple microdilution test for detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing in *P. aeruginosa*. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4388-4390.
129. Lee K, Chong Y, Shin HB. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88-91.
130. Timothy R, Walsh T, Mark A, Toleman M. Laurent Poirel and Patrice Nordmann<sup>2</sup>. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306–325.
131. Zavascki A, Barth A, Goncalves A. The influence of metallo-beta-lactamase production on mortality in nosocomial *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 387-392.
132. Mastoraki A, Douka E, Kriaras I. *Pseudomonas aeruginosa* susceptible only to colistin in intensive care unit patients. *Surg Infect* 2008; 9: 153-160.
133. Lee Y, Ahn B, Jin J. Molecular characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates resistant to all antimicrobial agents, but susceptible to colistin, in Daegu, Korea. *J Microbiol* 2007; 45: 358-363.

134. Urban C, Segal-Maurer S, Rahal JJ. Considerations in control and treatment of nosocomial infections due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 1268–1274.
135. Sambrook J, Russel DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Appendices preparation of reagents and buffers used in *Molecular cloning*. 3rd Edition NY: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001;
136. Ulusoy Al M, Mumcuoğlu İ, Aksu N, Dolapçı İ. İmipenem dirençli *Acinetobacter* suşlarında metallo-beta-laktamaz üretiminin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2011; 41: 29-36,
137. Bal Ç, Bauernfeind A, Aydın AE, Anđ Ö. Çoğul dirençli *Klebsiella pneumonia* suşlarında lazmidik sefamisinaz CMY 2. *İnfeks Derg* 1995; 9: 67-69.
138. Luzzaro F, Endimiani A, Docquier JD. Prevalance and characterization of metallo-beta-actamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Diag Microbiol Infect Dis* 2004; 48: 131-135.
139. Patridge S, Brown H, Hall R. Charectarization and movement of the class 1 integron known as Tn2521 and Tn1405. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1288–1294.
140. Lee K, Lim JB, Yum JH. blaVIM–2 cassette-containing novel integrons in metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* isolates disseminated in a Korean Hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 1053–1058.
141. Pournaras S, Maniati M, Petinaki E, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Legakis NJ, Maniatis AN. Hospital outbreak of multiple clones of *Pseudomonas aeruginosa* carrying the unrelated metallo- $\beta$ -lactamase gene variants blaVIM–2 and blaVIM–4. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1409–1414.
142. Bush K, Jacoby G. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-976.
143. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden izole edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallobetalaktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 248–252.

144. Gülay Z. Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003–2004 Türkiye Haritası, Ankem Derg 2005; 19: 66–77.
145. Cesur S, Albayrak F, Birengel S, Kolcu Z, Tekeli E. Çeşitli Klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının karbapenem ve diğer antibiyotiklere duyarlılıkları. Türk Mik Cem Derg 2002; 33: 203–206
146. Akan O A. Antibiyotik resistance of *Acinetobacter baumannii* isolates data from İbni Sina Hospital for the year 2002 Mikrobiyol Bul 2003; 37: 241–246
147. Tatman Oktun M, Gürcan S, Özer B, Shakkrylanbaran N. Annual trends in antibiotic resistance of nosocomial *Acinetobacter baumannii* strains and the effect of synergistic antibiotic combinations. New Microbiol 2004; 27: 1–8.
148. Yücel M, Gündüz E, Yağcı S, Karakoç AE, Önde U, Acar N. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* türlerinde antibiyotik direnç oranlarının belirlenmesi. Türk Mik Cem Kongre Kitapçığı 2002: 280.
149. Toraman Aşçı Z, Çelik A. Investigation of antibiotic susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*. Which isolated from Clinical specimens. Fırat med journ 2003; 2: 8.
150. Yong D, Lee K, Yum JH. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo-beta-lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. And *Acinetobacter* spp. J Clin Microbiol 2002; 40: 3798-3801.
151. Altoparlak U, Aktas F, Celebi D, Ozkurt Z, Akcay MN. Prevalence of metallo-beta-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. Burns 2005; 31: 707–710.
152. Oh EJ, Lee S, Park YJ. Prevalence of metallo-β-lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean university hospital and comparison of screening methods for detecting metallo-β-lactamase. J Microbiol Methods 2003; 54: 411-418.
153. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L. Detecting of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. J Clin Microbiol 2005; 43: 3129-3135.



154. Lee K, Lim Y S, Yong D, Yum J H, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk-synergy test for differentiating metallo-beta-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol* 2003; 41: 4623–4629.
155. Lee K, Chong Y, Shin H B. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-B-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88–91.
156. Jesudason MV, Kandathil AJ, Balaji V. Comparison of two methods to detect carbapenemase and metallo-beta-lactamase-production in clinical isolates. *Indian J Med Res* 2005; 121: 780–783
157. Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K. Convenient test for screening metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 40-43.
158. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Sanchez AD, Biddle JW, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1151–61.
159. Noyal MJC, Menezes GA, Harish BN, Sujatha S, Parija SJ. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. *Indian J Med Res* 2009; 129: 707-712.
160. Walsh T R, Balmström A, Owarnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-beta-lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755–9.
161. Toraman Z A, Yakupogulları Y, Kizirgil A. Detection of metallo-beta-lactamase production and antibiotic resistance with Etest method in *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Klebsiella* strains in Turkey. *J Infect Chemother* 2004; 10: 257–261.
162. Bayraktar B, Yıldız D, Bulut E. Yoğun bakım ünitesinden elde edilen karbapeneme dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında metallo-beta laktamaz üretiminin araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2004; 34: 248–252.

163. Rossolini GM, Luzzaro F, Migliavacca R. First countrywide survey of acquired metallo-beta-lactamases in Gram-negative pathogens in Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4023-4029.
164. Walsh T, Bolmström A, Qwarmström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo- $\beta$ -lactamases in routine clinical testing. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2755-2759.
165. Lee K, Yong D, Yum JH. Evaluation of Etest MBL for detection of blaIMP-1 and blaVIM-2 allele-positive clinical isolates of *Pseudomonas* species and *Acinetobacter* species. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 942-944.
166. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2008; 21: 538-82.
167. Peleg AY, Hooper DC. Hospital-acquired infections due to Gram-negative bacteria. *N Engl J Med* 2010; 362: 1804-13.
168. Brötz-Oesterhelt H, Sass P. Postgenomic strategies in antibacterial drug discovery. *Future Microbiol* 2010; 5: 1553-79.
169. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect* 2009; 59 : 4-16.
170. Liew YX, Lee W, Kwa AL, Lye DC, Yeo CL, Hsu LY. Inappropriate carbapenem use in Singapore public hospitals: opportunities for antimicrobial stewardship. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 87-88.

## 6. ÖZGEÇMİŞ

Beş Ocak 1982 tarihinde, Konya’da dünyaya geldim. İlk ve ortaöğrenimimi Konya’da tamamladım. 2000 yılında Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi’nde Tıp eğitimime başladım. 2006 yılında mezun oldum. 2006-2008 yılları arasında Van Özalp Sağmalı, Kastamonu Merkez Akteke ve Çanakkale Gökçalı Sağlık ocaklarında pratisyen hekim olarak görev yaptım. 2008 yılı Aralık ayında Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda ihtisas eğitimime başladım. Evliyim.